



**HAL**  
open science

# Etude de l'expression des cytochromes P 450 aromatasés comme marqueurs biologiques d'une perturbation endocrinienne chez le poisson

Nathalie Hinfray

► **To cite this version:**

Nathalie Hinfray. Etude de l'expression des cytochromes P 450 aromatasés comme marqueurs biologiques d'une perturbation endocrinienne chez le poisson. Toxicologie. Université Paul Verlaine - Metz, 2006. Français. NNT: 2006METZ021S . tel-01777250

**HAL Id: tel-01777250**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01777250>**

Submitted on 24 Apr 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

# THESE

présentée devant

l'Université de METZ  
UFR Sciences fondamentales et Appliquées

Pour l'obtention du grade de Docteur  
Spécialité : Toxicologie de l'Environnement

Par Nathalie HINFRAY



## **Etude de l'expression des cytochromes P450aromatases comme marqueurs biologiques d'une perturbation endocrinienne chez le poisson**

soutenue le 15 décembre 2006

Devant le jury formé de :

**Pr. C. MINIER**  
**Dr. A. FOSTIER**  
**Pr. H. SEGNER**  
**Dr. S. GIMENO**  
**Pr. P. VASSEUR**  
**Dr. F. BRION**

Université du Havre  
INRA Rennes  
Université de Bern  
Procter & Gamble  
CNRS Metz  
INERIS Verneuil-en-Halatte

**Président du jury**  
**Rapporteur**  
**Rapporteur**  
**Examineur**  
**Examineur**  
**Examineur**

UNIVERSITE Paul Verlaine METZ S.C.D.	
N° Inv.	
Cote	
Loc	

## REMERCIEMENTS

*Cette thèse a été réalisée au laboratoire d'écotoxicologie de l'Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS) et a bénéficié des financements du budget civil de recherche et développement et d'une bourse de thèse de l'Association Nationale pour la Recherche Technique (ANRT, bourse CIFRE).*

*J'exprime ma profonde gratitude et mes sincères remerciements à l'ensemble des personnes avec lesquelles j'ai eu l'occasion d'interagir au cours de ce travail de thèse :*

*A. Fostier et H. Segner qui m'ont fait l'honneur d'accepter la lourde tâche de rapporteur de cette thèse, ainsi qu'aux membres du jury : S. Gimeno et C. Minier ;*

*Paule Vasseur qui a accepté la direction de ce travail et qui m'a accordé sa confiance ;*

*Eric Thybaud, responsable de l'unité d'évaluation des risques écotoxicologiques de l'INERIS, pour m'avoir permis de réaliser ma thèse dans son unité ;*

*Jean-Marc Porcher pour m'avoir accueillie au sein de son équipe ;*

*François Brion, mon encadrant de thèse, qui a su se rendre toujours disponible quand j'en avais besoin, me guider et m'encourager tout au long de ce travail, et sans qui cette étude n'aurait pas été possible ;*

*Olivier Palluel pour son appuis technique, sa bonne humeur et ses choix musicaux avisés !*

*Dominique Hervin, Olivier Dupont, et Benjamin Piccini pour leur bonne humeur et leur décontraction, et surtout pour avoir pris soin de nos amis les poissons ;*

*Nathalie Laville, Bénédicte Guillet, Catherine Brulez et Marie-Estelle Gouze pour leur aide, leur bonne humeur et leur joie de vivre au quotidien, durant le temps où chacune est passée à « l'étage » ;*

*Selim Aït-Aïssa pour ses conseils avisés ;*

*J'aimerais également remercier l'ensemble des personnes des équipes d'écotoxicologie et de toxicologie de l'INERIS pour leur convivialité, ainsi qu'à tous les stagiaires qui sont passés par le laboratoire.*

*Je suis spécialement reconnaissante à Olivier Kah, Elisabeth Pellegrini, Marie-Madeleine Gueguen et à toutes les personnes de l'équipe d'Endocrinologie Moléculaire de la Reproduction, de l'université de Rennes 1, sans qui une partie de ce travail n'aurait pas été possible.*

*Enfin, un clin d'œil spécial à mes deux colocataires, Sophie Desmots et Wilfried Sanchez, avec qui j'ai partagé plein de joies mais aussi de galères dans notre chaleureuse maison de Verneuil, et que j'aimerais vraiment remercier pour leur aide, leur écoute, leur joie de vivre et leur bonne humeur quotidienne qui m'ont été si précieuses (j'ai dit chaleureuse ?)*

## TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES .....	1
RESUME.....	5
ABSTRACT .....	6
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS .....	9
INTRODUCTION GENERALE.....	11
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE .....	13
I. LES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS.....	13
II. LES BIOMARQUEURS.....	15
III. LA STERIDOGENESE.....	16
IV. L'AROMATASE .....	17
IV.1. Le complexe aromatase .....	17
IV.2. Gènes et régulations.....	19
IV.3. Méthodes de mesure de l'expression des aromatasés.....	23
IV.4. Expression / activité aromatase.....	24
IV.4.1 Expression / activité en fonction du tissu .....	24
IV.4.2 Répartition tissulaire et localisation cellulaire des expressions.....	27
IV.4.3 Expression / activité au cours du développement .....	29
IV.4.4 Expression / activité au cours du cycle reproducteur .....	30
IV.5. Rôle physiologique de l'aromatase.....	31
IV.5.1 Aromatase et neurogenèse.....	31
IV.5.2 Aromatase et comportement.....	32
IV.5.3 Aromatase, reproduction et différenciation sexuelle .....	33
IV.6. Perturbations de l'aromatase.....	35
IV.6.1 Etudes de laboratoire .....	35
IV.6.2 Etudes in situ .....	42
V. OBJECTIFS .....	43
VI. ORGANISATION DU MANUSCRIT .....	43
MATERIELS ET METHODES .....	45
I. CHOIX METHODOLOGIQUES .....	45

I.1. Choix des modèles biologiques .....	45
I.1.1 <i>Truite Arc-en-ciel</i> .....	45
I.1.2 <i>Poisson zèbre</i> .....	46
I.2. Démarche et choix des méthodes de dosages.....	47
I.3. Choix des molécules.....	47
I.3.1 <i>Choix des molécules modèles</i> .....	47
I.3.2 <i>Polluants environnementaux</i> .....	48
II. METHODES DE DOSAGE DES EXPRESSIONS / ACTIVITES AROMATASES.....	48
II.1. Dosages d'ARNm des gènes cyp19a et cyp19b .....	48
II.1.1 <i>Principe du dosage</i> .....	48
II.1.2 <i>Expression des résultats</i> .....	50
II.2. Détection des protéines P450 aromatasés de poisson zèbre .....	50
II.2.1 <i>Synthèse des anticorps anti-P450aroA et B de poisson zèbre</i> .....	51
II.2.2 <i>Caractérisation des anticorps anti-P450aroA et anti-P450aroB</i> .....	51
II.3. Mesure des activités enzymatiques P450 aromatasés chez la truite et le poisson zèbre.....	53
II.3.1 <i>Principe de la méthode de l'eau tritiée</i> .....	53
II.3.2 <i>Expression des résultats</i> .....	55
RESULTATS .....	57
I. DÉVELOPPEMENTS DE MÉTHODES DE MESURE DES P450 AROMATASES... 57	
I.1. Objectifs.....	57
I.2. Résultats et discussion .....	57
I.2.1 <i>Méthode de mesure de l'expression des gènes cyp19 chez le poisson zèbre</i> .....	58
I.2.2 <i>Méthode de mesure de l'expression des protéines P450aromatase A et B chez le poisson zèbre</i> .....	59
I.2.3 <i>Quantification des activités enzymatiques P450aromatases dans le cerveau et les gonades de poissons zèbres et de truites arc-en-ciel</i> .....	65
I.3. Conclusions .....	68
II. CARACTERISATION DES EXPRESSIONS / ACTIVITES AROMATASES CHEZ LE POISSON ZEBRE.....	69
II.1. Objectifs.....	69
II.2. Résultats et discussions.....	69

II.2.1	<i>Caractérisation des expressions des gènes cyp19a et cyp19b chez les larves et les adultes sexuellement mûres</i> .....	69
II.2.2	<i>Caractérisation de l'expression de la P450aroB chez les larves et les adultes sexuellement mûres</i> .....	73
II.2.3	<i>Caractérisation des activités aromatasés chez les adultes sexuellement mûres</i> .....	75
II.2.4	<i>Facteur influençant les expressions / activités aromatasés</i> .....	77
II.3.	Conclusions.....	81
III.	EVALUATION DES PERTURBATIONS DE L'AROMATASE.....	82
III.1.	Perturbation des aromatasés par deux molécules modèles : l'œstradiol (E2) et l'androstatriènedione (ATD).....	82
III.1.1	<i>Objectif</i> .....	82
III.1.2	<i>Méthodologie</i> .....	82
III.1.3	<i>Résultats et discussion</i> .....	83
III.1.4	<i>Conclusions</i> .....	87
III.2.	Perturbation des aromatasés par des polluants environnementaux.....	87
III.2.1	<i>Perturbation in vitro des activités aromatasés (article 2)</i> .....	88
III.2.2	<i>Perturbation des aromatasés par le clotrimazole (article 3)</i> .....	90
III.2.3	<i>Perturbation des aromatasés par deux xéno-œstrogènes environnementaux : le nonylphénol et l'éthinyl-œstradiol (article 4)</i> .....	94
	DISCUSSION GÉNÉRALE .....	99
I.	MÉTHODES DE MESURES DES P450 AROMATASES CHEZ LE POISSON .....	99
II.	CARACTERISATION DES EXPRESSIONS DES AROMATASES CHEZ LE POISSON ZEBRE.....	102
II.1.	Influence de facteurs biologiques sur les aromatasés .....	102
II.2.	Influence de facteurs abiotiques sur les aromatasés .....	103
III.	PERTURBATIONS DES EXPRESSIONS AROMATASES CEREBRALES ET GONADIQUES.....	104
III.1.	Le gène cyp19b : biomarqueur candidat des xéno-œstrogènes .....	105
III.2.	Inhibition des expressions et des activités enzymatiques des P450aromatasés.....	107
IV.	CONSÉQUENCES FONCTIONNELLES DES PERTURBATIONS DE LA SYNTHÈSE D'ŒSTROGÈNES .....	109
IV.1.	Aromatase, vitellogenèse et gamétogenèse ?.....	109

IV.2. Aromatase et différenciation sexuelle.....	110
IV.3. Aromatase et effets neuroendocrines.....	110
IV.4. Aromatase et axe Hypothalamus-Hypophyse-Gonades .....	111
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	113
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	117



## RESUME

L'objectif de cette thèse est d'étudier les effets des perturbateurs endocriniens (PE) sur les enzymes à cytochrome P450 aromatasés cérébrales et gonadiques chez le poisson afin de déterminer si les expressions des aromatasés peuvent constituer des marqueurs biologiques potentiels d'une perturbation endocrinienne. Dans ce but, des méthodes de mesure permettant d'étudier les aromatasés à différents niveaux d'expression (gène, protéine et activité enzymatique) ont été développées et ont permis d'acquérir des informations originales sur la caractérisation des expressions des aromatasés dans le cerveau et les gonades chez le poisson zèbre (*Danio rerio*).

*In vitro* à l'aide d'un test sur microsomes de cerveaux et d'ovaires de truite (*Oncorhynchus mykiss*) qui a été développé dans ce travail, les effets de polluants environnementaux sur les activités d'aromatation ont été recherchés et ont permis de caractériser le potentiel inhibiteur de plusieurs pesticides parmi lesquels le clotrimazole, un fongicide de la famille des imidazoles, s'est avéré le plus actif. *In vivo*, nous montrons que diverses substances chimiques affectent les P450 aromatasés cérébrales et gonadiques par des mécanismes d'action tissu-spécifiques. Alors que l'androstatriènedione (un inhibiteur stéroïdien des P450 aromatasés), inhibe les activités d'aromatation dans le cerveau et les ovaires, le clotrimazole dont nous avons montré les capacités d'inhibitions *in vitro*, provoque chez les femelles des effets beaucoup plus complexes qui sont dépendants du tissu cible étudié ainsi que de la concentration d'exposition, les effets au niveau des gènes ne reflétant pas nécessairement les effets observés aux niveaux enzymatiques. Enfin, nous montrons que les xéno-œstrogènes inhibent l'expression de l'aromatase ovarienne mais induisent l'expression de l'aromatase cérébrale par un mécanisme ER-dépendant démontrant ainsi que la mesure de l'induction de l'aromatase dans le cerveau constitue chez le poisson un marqueur biologique d'exposition à des composés œstrogéniques. Si nos travaux permettent de mieux appréhender les mécanismes d'actions et les effets des PE chez le poisson, notamment chez les femelles, il n'en reste pas moins que la question des effets des perturbations de l'expression des aromatasés sur la reproduction des poissons n'a pas été abordée. Ce point est pourtant essentiel si l'on souhaite utiliser efficacement ces variables pour évaluer le risque des substances chimiques.

Mots clés : P450 aromatasés, poisson zèbre (*Danio rerio*), truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), biomarqueurs, *in vitro*, *in vivo*, cerveau, gonades, (xéno)-œstrogènes, pesticides.

## ABSTRACT

The objective of this work was to study the effects of endocrine disrupting chemicals (EDCs) on brain and gonadal P450aromatase in fish in order to determine to which extent these genes or their products could be used as biomarkers of endocrine disruption in fish. We first developed methods to measure *cyp19a* and *cyp19b* mRNA and protein levels, as well as activity of brain and gonadal aromatase in zebrafish (*Danio rerio*). These methods allowed us to obtain relevant and original data on the expression of aromatases in this species. Next, we assessed the effects of several environmental pollutants and characterized the inhibitory potency of several pesticides using an *in vitro* assay based on brain and gonadal microsomal aromatase from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Clotrimazole, an imidazole fungicide used as a pharmaceutical, was found to be the most active substance among the tested pesticides. *In vivo*, we observed that various substances can perturb brain and gonadal aromatase and elicit tissue-specific responses. While androstadienedione (a steroidal inhibitor of aromatase) inhibited aromatase activity in both brain and gonads without affecting *cyp19* expression, the *in vivo* action of clotrimazole (characterized as an aromatase inhibitor *in vitro*) was more complex. The effects of this molecule differed depending on the target tissue and the concentration used for exposure. Moreover, the effects observed on the mRNA levels did not allow to predict the effects on the aromatase activity. Finally, we showed that some xeno-estrogens are able to inhibit ovarian aromatase gene expression and at the same time to induce brain aromatase at the gene and protein level through an estrogen receptor (ER)-dependent mechanism. This demonstrates that measurement of *cyp19b* induction is a relevant biomarker of exposure to estrogenic compounds. Taken together, our work provides new and relevant data concerning the effects and mechanisms of action of EDCs in fish, especially in female individuals. However, to determine the physiological and reproductive consequences of aromatase perturbation, further research is needed. Such knowledge is critical for establishing the use of these biomarkers in risk assessment of EDCs.

Keywords : P450 aromatase, brain, gonads, zebrafish (*Danio rerio*), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), biomarkers, *in vitro*, *in vivo*, (xeno)-estrogens, pesticides.

## Abréviations

<b>4OHA</b> : 4-hydroxyandrostènedione	4-hydroxyandrostenedione
<b>4-t-OP</b> : 4-tert-octylphénol	4-tert-octylphenol
<b>4-t-PP</b> : 4-tert-pentylphénol	4-tert-pentylphenol
<b>AC</b> : Anticorps	Antibodies
<b>ADNb</b> : ADN branché	Branched DNA
<b>AhR</b> : Récepteur des aryl hydrocarbonés	Aryl hydrocarbons receptor
<b>AhRE</b> : Élément de réponse aux aryl hydrocarbonés	Aryl hydrocarbon responsive element
<b>AMPc</b> : Amine Mono Phosphate cyclique	Cyclic mono phosphate amine
<b>ARE</b> : Élément de réponse aux androgènes	Androgens responsive element
<b>ARNm</b> : Acide Ribo Nucléique messenger	Ribo nucleic acide messenger
<b>ATD</b> : 1,4,6-androstatriènedione	1,4,6-androstatrienedione
<b>BPA</b> : Bisphénol A	Bisphenol A
<b>BSA</b> : Albumine de sérum bovin	Bovine Serum Albumine
<b>CRE</b> : élément de réponse à l'AMPc	AMPc responsive element
<b>DDT</b> : Dichloro-diphényl-éthane	Dichloro-diphenyl-ethane
<b>E2</b> : Oestradiol	Estradiol
<b>EE2</b> : Ethinyl-oestradiol	Ethinylestradiol
<b>ER</b> : Récepteur des œstrogènes	Estrogens receptor
<b>ERE</b> : Élément de réponse aux œstrogènes	Estrogens responsive element
<b>FTZ-F1</b> : Fushi Tarazu facteur 1	Fushi Tarazu factor 1
<b>GATA2</b> : élément de réponse au facteur de transcription GATA2	GATA2 responsive element
<b>GATA4</b> : élément de réponse au facteur GATA4	GATA4 responsive element
<b>GnRH</b> : Gonadolibérine	Gonadotropin-releasing hormone
<b>GSI</b> : Indice gonado-somatique	Gonado-somatic index
<b>HAP</b> : hydrocarbures aromatiques polycycliques	Polycyclic aromatic hydrocarbure
<b>Hpf</b> : Heures post fertilisation	Hours post fertilization
<b>HSD</b> : Hydroxystéroïde déshydrogénase	Hydroxysteroid dehydrogenase
<b>Jpf</b> : Jours post fertilisation	Days post fertilization
<b>Km</b> : affinité d'une enzyme pour un substrat	Enzyme-substrate affinity
<b>NADPH</b> : Nicotinamine Dinucléotide Phosphate réduit	Reduced Nicotinamine Dinucleotide Phosphate
<b>NBRE</b> : élément de réponse au facteur Nur77	Nur77 factor responsive element
<b>NP</b> : Nonylphénol	Nonylphenol
<b>P450aro</b> : Cytochrome P450 aromatase	P450aromatase cytochrome
<b>P450c11</b> : 11-beta-hydroxylase	11-beta-hydroxylase
<b>P450c17</b> : 17-beta-hydroxylase	17-beta-hydroxylase
<b>P450sec</b> : Cytochrome 11A1	P450 side chain cleavage cytochrome
<b>PCB</b> : Polychlorobiphényles	Polychlorobiphenyls
<b>PM</b> : Poids moléculaire	Molecular weight
<b>PPAR</b> : élément de réponse aux récepteurs des proliférateurs des péroxisomes	Peroxisome proliferator responsive element
<b>RXR</b> : élément de réponse aux récepteurs des rétinoïdes X	Retinoid X receptors responsive element
<b>SF-1</b> : élément de réponse au facteur stéroïdogénique 1	Steroidogenic factor1 responsive element
<b>TBT</b> : Tributyl étain	Tributyltin
<b>Vmax</b> : activité catalytique	Catalytic activity

## Espèces de poissons citées

Nom français	Nom latin	Nom anglais
Anguille japonaise	<i>Anguilla japonica</i>	Japanese eel
Brème	<i>Abramis brama</i>	Bream
Carpe	<i>Cyprinus carpio</i>	Carp
Dorade japonaise	<i>Pagrus major</i>	Red seabream
Dorade royale	<i>Sparus aurata</i>	Gilthead seabream
Espadon	<i>Xiphias gladius</i>	Swordfish
Flet	<i>Paralichthys sp. ou Platicthys sp.</i>	flounder
Gambusie	<i>Gambusia affinis</i>	Mosquitofish
Gardon	<i>Rutilus rutilus</i>	Roach
Gobie	<i>Trimma okinawae</i>	Goby
Gobie à bandes bleues	<i>Lythrypnus dalli</i>	Blue banded goby
Guppy	<i>Poecilia reticulata</i>	Guppy
Loup de mer (Bar)	<i>Dicentrarchus labrax</i>	Sea bass
Marlin	<i>Tetrapturus belone</i>	Mediterranean spearfish
Medaka	<i>Oryzias latipes</i>	Medaka
Ombre de fontaine	<i>Salvelinus fontinalis</i>	Brook trout
Perche	<i>Perca fluviatilis</i>	Perch
Poisson chat	<i>Ictalurus punctatus</i>	Channel catfish
Poisson crapaud à nageoires unies	<i>Porichthys notatus</i>	Plainfin midshipman
Poisson killi	<i>Fundulus heteroclitus</i>	Killifish
Poisson lapin doré	<i>Siganus guttatus</i>	golden rabbitfish
Poisson rouge	<i>Carassius auratus</i>	Goldfish
Poisson zèbre	<i>Danio rerio</i>	Zebrafish
Rivulus	<i>Rivulus marmoratus</i>	Rivulus
Saumon atlantic	<i>Salmo salar</i>	Atlantic salmon
Tambour brésilien	<i>Micropogonias undulatus</i>	Atlantic croaker
Thon rouge	<i>Thunnus thynnus</i>	Bluefin tuna
Pagre tête noire	<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	Black porgy
Tilapia	<i>Oreochromis niloticus</i>	Nile tilapia
Truite arc-en-ciel	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Rainbow trout
Vairon à tête de boule	<i>Pimephales promelas</i>	Fathead minnow

## PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

### Articles :

**Hinfray, N.**, Palluel O., Turies C., Cousin C., Porcher J.M., Brion F., 2006. Brain and gonadal aromatase as potential targets of endocrine disrupting chemicals in a model species, the zebrafish (*Danio rerio*), *Environmental Toxicology*, 21 (4), 332-337.

**Hinfray, N.**, Porcher, J.M., Brion, F., Inhibition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) P450 aromatase activities in brain and ovarian microsomes by various environmental substances. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Toxicology and Pharmacology*. In press.

**Hinfray N.**, Aït-Aïssa S., Le Page Y., Gouze M.E., Porcher J.M., Pakdel F., Brion F., Effect of clotrimazole on brain and gonadal aromatase in zebrafish (*Danio rerio*). En préparation.

**Hinfray N.**, Palluel O., Porcher J.M., Kah O., Pakdel F., Brion F. Effect of nonylphenol on steroidogenic genes expression in zebrafish (*Danio rerio*). En préparation.

### Communications orales :

**Hinfray, N.**, Pellegrini, E., Kah, O., Porcher, J.M., Pakdel, F., Brion, F. Brain and gonadal aromatase as potential targets for endocrine disrupting chemicals (EDCs) in a model species, the zebrafish (*Danio rerio*). 12th International Symposium on Toxicity Assessment (ISTA), Skiathos, 12-17 June 2005.

Brion, F., **Hinfray, N.**, Pellegrini, E., Porcher, J.M., Kah, O., Pakdel, F., Brain and gonadal aromatase as potential targets of endocrine disrupting chemicals in a model species, the zebrafish (*Danio rerio*), Poster spotlight, 15<sup>th</sup> European Congress of the SETAC, Lille, 22-26 May 2005.

**Hinfray, N.**, Porcher, J.M., Brion, F. In vitro effect of various environmental pollutants on brain and ovarian aromatase activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). 14<sup>th</sup> European Congress of the SETAC, Prague, 18-22 April 2004.

### Communications affichées :

**Hinfray N.**, Palluel O., Porcher J.M., Kah O., Pakdel F., Brion F. The xeno-estrogen nonylphenol affects brain and ovarian aromatase expression in the zebrafish (*Danio rerio*), 2<sup>nd</sup> International conference on Molecular Research in Environmental Medicine, Paris, 7-8 Septembre 2006.

Brion, F., **Hinfray, N.**, Pellegrini, E., Porcher, J.M., Kah, O., Pakdel, F., Brain and gonadal aromatase as potential targets of endocrine disrupting chemicals in a model species, the zebrafish (*Danio rerio*), 15<sup>th</sup> European Congress of the SETAC, Lille, 22-26 May 2005.

Brion, F., **Hinfray, N.**, Laville, N., Aït-Aïssa, S., Porcher, JM. Assessment of the endocrine disrupting effects of several currently used pesticides using complementary *in vitro* tests. CREDO Cluster workshop on ecological relevance of chemically-induced endocrine disruption in wildlife, Exeter, 5-7 July 2004.

### Travaux associés:

#### **Article :**

Laville N., Balaguer P., Brion F., **Hinfray N.**, Casellas C., Porcher J.M., Aït-Aïssa S., 2006. Modulation of aromatase activity and mRNA by various selected pesticides in the human choriocarcinoma JEG-3 cell line. *Toxicology*, 228, 98-108

#### **Communication orale :**

Aït-Aïssa, S., Laville, N., Brion, F., Lemaire, G., **Hinfray, N.**, Porcher, J.M., Balaguer, P. *In vitro* assessment of the potency of pesticides to interact with multiple molecular endocrine targets, 2<sup>nd</sup> International conference on Molecular Research in Environmental Medicine, Paris, 7-8 Septembre 2006.



## INTRODUCTION GENERALE

Depuis une vingtaine d'années, un grand nombre de recherches ont été menées sur les perturbateurs endocriniens en raison des dangers qu'ils présentent pour l'homme et les écosystèmes. Ces composés peuvent causer des effets néfastes sur la santé d'un organisme ou sa descendance secondairement à des changements de la fonction endocrine (WHO, 2002). Les perturbateurs endocriniens regroupent des substances d'origines et de structures très diverses. Ce sont des composés naturels tels que les hormones stéroïdiennes (œstradiol, œstrone) et les phyto-œstrogènes ou bien des composés chimiques synthétiques tels que les hormones de synthèse, les alkylphénols, les polychlorobiphényles et dérivés, certains pesticides organochlorés (DDT, chlordécone) ainsi que certains phtalates. Les mécanismes d'actions des perturbateurs endocriniens sont multiples puisqu'ils peuvent potentiellement agir sur l'ensemble des étapes de la régulation endocrine depuis la synthèse des hormones jusqu'à la réponse des cellules cibles (Kavlock *et al.*, 1996). Dans l'environnement aquatique, les composés les plus souvent incriminés sont les œstrogènes mimétiques qui sont capables de se lier en tant qu'agonistes aux récepteurs des œstrogènes et d'induire des réponses similaires à celles des œstrogènes endogènes. Les réponses biologiques induites vont des réponses primaires moléculaires et biochimiques, comme l'induction de la synthèse de vitellogénine (protéine précurseur du jaune de l'œuf normalement produite par les femelles au cours du cycle reproducteur) chez les poissons mâles et juvéniles exposés à des œstrogènes mimétiques (Sumpter and Jobling, 1995; Harries *et al.*, 1996; Islinger *et al.*, 2002), à des réponses secondaires tissulaires (formation d'ovo-testis : ovocytes au sein du tissu testiculaire), morphologiques (modification des caractères sexuels secondaires), ou comportementales qui affectent les capacités de reproduction des individus (Bjerselius *et al.*, 2001; Oshima *et al.*, 2003).

Face aux risques liés à l'exposition des organismes aquatiques aux perturbateurs endocriniens, il paraît nécessaire de mettre en place des outils permettant de détecter précocement les altérations de fonctions de la reproduction, avant que des effets irréversibles ne soient observables aux niveaux des populations et des écosystèmes. C'est dans cette optique que les chercheurs se sont intéressés à la mesure de biomarqueurs biochimiques et histologiques qui sont des variables sensibles et précoces aptes à fonder un diagnostic sur la qualité de l'écosystème ainsi que sur la nature et le degré de contamination. Parmi, les marqueurs

biologiques les plus étudiés, la mesure de l'induction de la vitellogénine chez le poisson s'avère un marqueur biologique d'exposition sensible et spécifique des composés mimétiques d'œstrogènes mais son interprétation en terme d'effets avérés sur la reproduction n'est pas évidente (Parks *et al.*, 1999).

La recherche de variables biologiques pour lesquelles il existe un lien mécanistique fort avec des fonctions de reproduction est donc un axe de recherche important. Parmi l'ensemble des variables biologiques potentielles, l'étude des effets des perturbateurs endocriniens sur les enzymes de la stéroïdogénèse semble prometteuse. Parmi ces enzymes de la stéroïdogénèse, l'aromatase joue un rôle majeur puisqu'elle est responsable de la conversion irréversible des androgènes en œstrogènes , impliqués dans le développement et la reproduction chez les vertébrés.



## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

### I. LES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS

Il est aujourd'hui clairement démontré que des substances présentes dans l'environnement aquatique sont potentiellement capables de perturber la physiologie et l'endocrinologie des organismes (Sumpter, 1998; Tyler *et al.*, 1998). Ces substances ont été regroupées sous le terme générique de perturbateurs endocriniens. Elles ont été définies comme " des substances exogènes qui interfèrent avec les processus de synthèse, de sécrétion, de transport, d'action ou d'élimination des hormones responsables de l'homéostasie, de la reproduction et du comportement " (Kavlock *et al.*, 1996). Plus récemment, elles ont été définies comme des " substances exogènes qui provoquent des effets néfastes sur la santé d'un organisme ou de sa descendance, secondairement à des changements dans la fonction endocrine " (WHO, 2002). Ces composés présentent des origines ainsi que des structures très diverses. De manière non exhaustive, il peut s'agir de substances naturelles telles que les hormones stéroïdiennes (œstradiol, œstrone, testostérone) et les phyto-œstrogènes (isoflavones et lignine) ou encore de composés synthétiques tels que les hormones de synthèse (17- $\alpha$ -éthinyloœstradiol), des alkylphénols (nonylphénol, octylphénol), des polychlorobiphényles (PCB) et leurs dérivés, de certains pesticides organochlorés (dichloro-diphényl-trichloroéthane (DDT), chlordécone), ainsi que de certains phtalates.

A l'heure actuelle, peu d'informations sont disponibles sur le devenir et le comportement de ces composés dans l'environnement aquatique, et de ce fait, il est difficile de prédire le degré d'exposition des organismes à ces substances, ainsi que les effets qui en découlent. Toutefois, un certain nombre d'études ont permis de mettre en évidence des effets liés à l'exposition à des perturbateurs endocriniens chez les mollusques, les poissons, les reptiles, les oiseaux et les mammifères, et la plupart des études proviennent du milieu aquatique (pour revue voir Tyler *et al.*, 1998). L'exemple le plus documenté d'une perturbation endocrinienne causant des effets sévères au niveau de la population est certainement le phénomène d'imposexe (apparition d'un pénis chez les femelles) observé chez les mollusques gastéropodes exposés au tributyl étain (TBT) (Gibbs and Bryan, 1986). Chez les poissons, il existe plusieurs exemples d'études ayant mis en évidence des perturbations endocriniennes après exposition en milieu naturel à des produits chimiques. En 1981, des altérations des fonctions

thyroïdiennes ont été mises en évidence chez des poissons prélevés dans différents lacs aux Etats-Unis (Moccia *et al.*, 1981). En Floride, des changements de comportement ainsi qu'une masculinisation des femelles furent observés chez des gambusies vivants en aval d'effluents d'une usine de pâte à papier (Bortone *et al.*, 1989). Différentes études réalisées aux Etats-Unis entre 1989 et 1994 montrent que les poissons exposés à des effluents blanchis d'usine à papier présentent des concentrations réduites en stéroïdes sexuels et en gonadotropines hypophysaires, des gonades de tailles plus réduites, une altération de leur fécondité, une absence de caractères sexuels secondaires chez les mâles, ainsi qu'une diminution de la taille du foie (Bortone *et al.*, 1989; Munkittrick *et al.*, 1991; Munkittrick *et al.*, 1992a; Munkittrick *et al.*, 1992b; Munkittrick and Van Der Kraak, 1994; Munkittrick *et al.*, 1994). En Grande-Bretagne, une étude a permis de mettre en évidence une incidence inhabituelle d'hermaphroditisme au sein d'une population de gardons vivant en aval d'un effluent de station d'épuration contenant des composés mimétiques d'œstrogènes, ainsi qu'une production de vitellogénine (protéine précurseur des réserves nutritives de l'œuf produite par les femelles) chez les gardons mâles (Purdom *et al.*, 1994). De plus, les études concernant l'effet de ces perturbateurs endocriniens sur les espèces de poissons marins sont moins nombreuses et plus récentes. En 1997, une étude réalisée chez le flet montrait une synthèse importante de vitellogénine chez les mâles prélevés dans un estuaire recevant un effluent de station d'épuration (Lye *et al.*, 1997). En 2002, une étude de Fossi *et al.* (2002) attire également l'attention sur l'effet des perturbateurs endocriniens sur les grand prédateurs (espadon, thon rouge et marlin) et de la mer méditerranée. Cette liste non exhaustive d'études montre bien que des substances présentes dans l'environnement aquatique sont capables de perturber le système endocrinien d'organismes très différents. Les effets et les mécanismes de ces perturbateurs endocriniens semblent être très variés et complexes, rendant difficile l'établissement d'un lien entre l'exposition et les effets observés au niveau de la population. Dans l'environnement, le seul exemple de ce lien entre l'exposition à un composé et les effets observés au niveau de la population est l'imposexe.

La diversité des cibles potentielles du système endocrinien ainsi que la diversité des molécules potentiellement capables de perturber ce système représentent la principale source de complexité lorsque l'on s'attache aux mécanismes d'actions des perturbateurs endocriniens. En effet, les mécanismes d'actions sont multiples puisque les perturbateurs endocriniens sont potentiellement capables de moduler ou de perturber la synthèse, la

sécrétion, le transport, la fixation, l'action, ou encore l'élimination des hormones endogènes (Kavlock *et al.*, 1996; Segner *et al.*, 2003).

Les mécanismes ayant reçu le plus d'attention sont ceux médiés par des récepteurs tels que le récepteur des œstrogènes (ER). En effet, un grand nombre de molécules est capable de se lier en tant qu'agoniste / antagoniste à ce récepteur en mimant l'action de son ligand naturel, l'œstradiol, et ainsi d'activer / inhiber l'activité transcriptionnelle du récepteur.

Face aux risques liés à l'exposition des organismes aquatiques aux perturbateurs endocriniens, il paraît nécessaire de mettre en place des outils permettant de détecter précocement les altérations de fonctions de la reproduction, avant que des effets irréversibles ne soient observables aux niveaux des populations et des écosystèmes. C'est dans cette optique que les chercheurs se sont intéressés à la mesure de biomarqueurs qui sont des variables sensibles et précoces aptes à fonder un diagnostic sur la qualité de l'écosystème ainsi que sur la nature et le degré de contamination.

## II. LES BIOMARQUEURS

Les biomarqueurs sont des indicateurs biochimiques, physiologiques ou histologiques d'exposition d'un organisme à des contaminants (Huggett *et al.*, 1992). Ces biomarqueurs, de part leur spécificité et leur précocité, sont des outils à fort potentiel même si un travail important reste à faire sur leur valeur prédictive quant à des impacts au niveau des populations.

Jusqu'à ces dernières années, de nombreux biomarqueurs ont été développés, pour mettre en évidence le potentiel perturbateur du système endocrinien des xénobiotiques ou d'échantillons environnementaux. Les recherches se sont intéressées principalement aux substances capables de mimer l'action du stéroïde naturel, le 17- $\beta$ -œstradiol (E2). L'une des réponses biologiques les plus étudiées chez les poissons exposés à ces substances est l'induction de la synthèse hépatique de la vitellogénine chez le poisson mâle. Cette protéine est un marqueur spécifique et sensible d'une perturbation endocrinienne par des xéno-œstrogènes (Islinger *et al.*, 2002; Van den Belt *et al.*, 2003). Des études ont également prouvé l'intérêt du gène *cyp1A* comme biomarqueur d'une perturbation par les hydrocarbures aromatiques qui interagissent avec les récepteurs des aryl hydrocarbones (AhR) (Safe *et al.*, 1998).

Très peu d'études se sont intéressées aux effets moléculaires des perturbateurs endocriniens sur l'expression d'autres gènes impliqués dans la reproduction. C'est pour cela que des études

récentes se focalisent sur le développement d'autres mesures biologiques capables de nous renseigner à la fois sur les modes d'actions des perturbateurs endocriniens et sur les effets de ces molécules sur la reproduction (différenciation sexuelle par exemple). Parmi ces variables biologiques étudiées, les enzymes de la stéroïdogénèse sont particulièrement intéressantes du fait de leur implication dans les processus de reproduction.

### III. LA STEROIDOGENESE

La stéroïdogénèse est le processus qui conduit à la synthèse des hormones stéroïdiennes à partir d'un précurseur commun, le cholestérol. Chez les poissons, les principaux tissus en charge de la stéroïdogénèse sont les gonades (ovaires et testicules), le cerveau et les glandes inter-rénales.

La stéroïdogénèse débute par la synthèse de prégnénolone, *via* le clivage de la chaîne latérale du cholestérol par le cytochrome P450 11A, et est supportée par un ensemble de réactions enzymatiques (Figure 1). Ces réactions enzymatiques aboutissent à la formation des stéroïdes sexuels, les androgènes et les œstrogènes. Cette voie de biosynthèse implique 4 cytochromes spécifiques : le cytochrome P45011A (P45011A), la 17- $\beta$ -hydroxylase/17,20-lyase (P450c17), la 11- $\beta$ -hydroxylase (P450c11) et l'aromatase (P450aro), ainsi que 2 déshydrogénases : la 3- $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase (3 $\beta$ -HSD) et la 17- $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase (17 $\beta$ -HSD) (Figure 1). Chez les mâles, la P450c11 permet la conversion de la 17-beta-hydroxyandrosténédione et de la 11-beta-hydroxytestostérone en adrénostérone et 11-kétotestostérone respectivement.

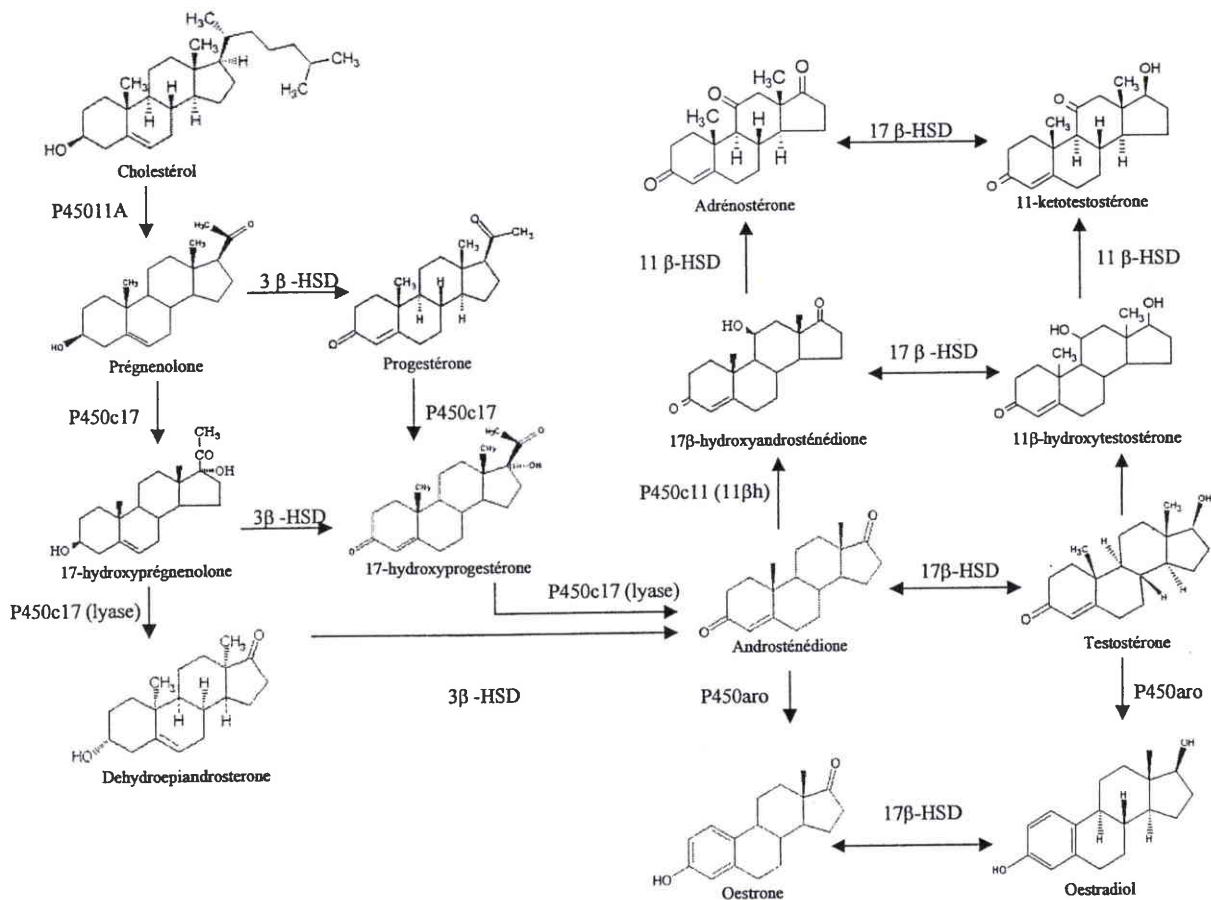


Figure 1 : Représentation schématique de la stéroïdogénèse gonadique chez la truite et le tilapia. P450 aro : cytochrome P450 aromatasase ; P450c11 : 11-beta-hydroxylase ; HSD : hydroxystéroïde déshydrogénase ; P45011A : cytochrome P450 11A ; P450c17 : 17-hydroxylase ou lyase (d'après Baroiller *et al.*, 1999).

Les cytochromes P450 tiennent donc une place importante dans le processus de stéroïdogénèse. Ils constituent de ce fait une cible de choix pour les xénobiotiques. Parmi ces cytochromes, le P450aromatase catalyse la dernière étape de la synthèse des œstrogènes qui sont des hormones impliquées dans le développement et la reproduction chez les vertébrés. Le cytochrome P450aromatase est donc une enzyme clé de la stéroïdogénèse.

#### IV. L'AROMATASE

##### IV.1. Le complexe aromatase

L'aromatase est une enzyme clé de la stéroïdogénèse, puisqu'elle est la dernière étape limitante pour la formation des œstrogènes. En effet, l'aromatase est responsable de la

conversion irréversible des androgènes en œstrogènes. Elle appartient à la superfamille des enzymes à cytochrome P450. L'aromatase est située au niveau du réticulum endoplasmique et se présente sous la forme d'un complexe multi-enzymatique constitué du cytochrome P450 aromatase et d'une flavoprotéine : la NADPH-cytochrome P450 réductase (Simpson *et al.*, 1994). Les stéroïdes à 19 carbones se fixent au site actif de l'aromatase et subissent trois hydroxylations successives aboutissant à la formation d'une boucle phénolique caractéristique des œstrogènes (appelée boucle A) (Simpson *et al.*, 1994; Lephart, 1996; Conley and Hinshelwood, 2001). En parallèle, la flavoprotéine transfère les équivalents réduits du NADPH au cytochrome P450 (Figure 2). La réaction catalysée par l'aromatase va consommer 3 moles d'oxygène et 3 moles de NADPH pour métaboliser une mole de stéroïdes à 19 carbones.

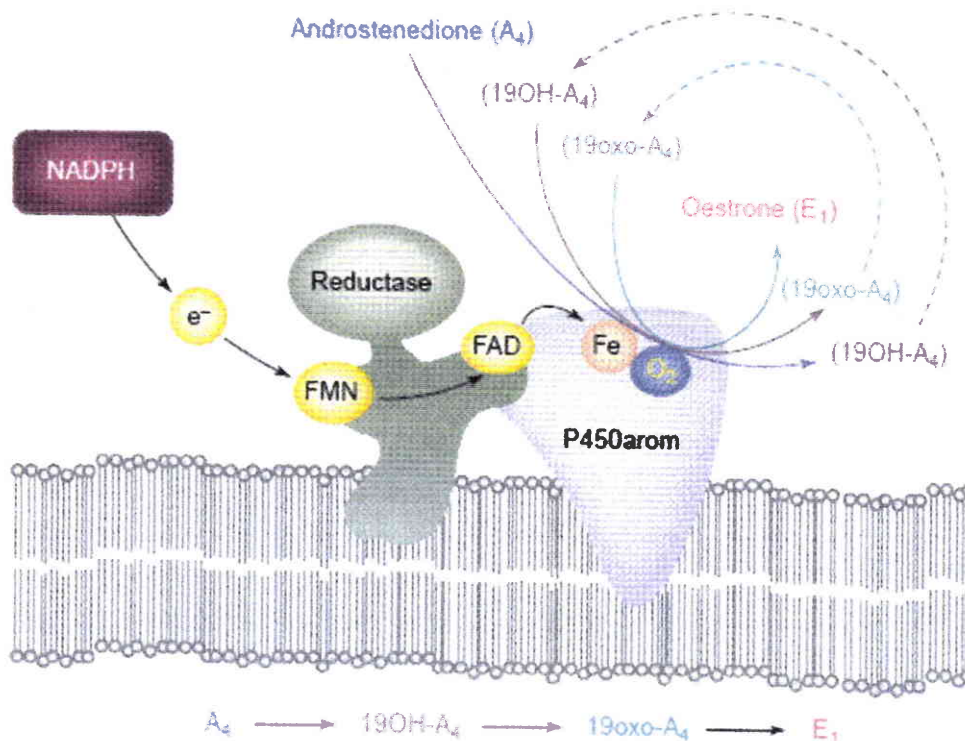


Figure 2 : Représentation schématique du complexe cytochrome P450 aromatase - NADPH réductase et des trois hydroxylations successives aboutissant à la formation des œstrogènes à partir des androgènes. Réductase : NADPH cytochrome P450 reductase ; P450 arom : cytochrome P450 aromatase ; NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate ; e⁻ : électron ; FMN : flavine mononucléotide ; FAD : flavine adénine dinucléotide ; Fe : fer ; O₂ : oxygène. (D'après Conley and Hinshelwood, 2001).

L'aromatase présente de nombreuses caractéristiques structurales communes à tous les cytochromes P450. Notamment au niveau de la partie C-terminale, il existe une région de fixation à l'hème qui contient un résidu cystéine conservé (Simpson *et al.*, 1994). L'aromatase est hautement conservée, notamment parmi les mammifères et tous les vertébrés, et montre une homologie dans la séquence peptidique allant de 50 à 90 % entre les formes de l'enzyme chez les poissons et celles chez les mammifères (Conley and Hinshelwood, 2001). De plus, le degré de conservation augmente dans le domaine fonctionnel de l'enzyme. Par exemple, les aromatasés de poissons zèbres présentent 54 % d'homologie avec celle de l'homme, alors que le degré d'homologie est de 87 % dans les régions spécifiques de l'aromatase, et de 71 % dans la région de l'hème (Kishida and Callard, 2001).

## IV.2. Gènes et régulations

L'aromatase est codée par le gène *cyp19*. Chez la plupart des mammifères, il n'existe qu'un seul gène *cyp19* codant pour l'aromatase, excepté chez le porc où deux gènes distincts sont exprimés (Corbin *et al.*, 1995). En revanche, chez la majorité des poissons étudiés tels que le poisson rouge, le poisson zèbre, la truite arc-en-ciel, le tilapia ou encore le loup de mer, deux gènes distincts ont été mis en évidence : le gène *cyp19a* et le gène *cyp19b* (Tchoudakova and Callard, 1998; Kishida and Callard, 2001; Dalla Valle *et al.*, 2002; Gonzalez and Piferrer, 2002; Chang *et al.*, 2005) qui codent pour des protéines distinctes ayant des propriétés catalytiques différentes (Zhao *et al.*, 2001; Gonzalez and Piferrer, 2002).

Chez le poisson zèbre, le gène *cyp19a* code pour une protéine de 517 acides aminés et le gène *cyp19b* code pour une protéine de 511 acides aminés. Le pourcentage d'identité dans les séquences d'acides aminés de ces deux protéines est de 60% (Chiang *et al.*, 2001). Il est intéressant de noter que l'isoforme A du poisson zèbre présente une identité plus importante avec l'isoforme A d'autres espèces de poissons comme le poisson rouge par exemple (90 % d'identité) (Tong *et al.*, 2001) qu'avec l'isoforme B du poisson zèbre (Chiang *et al.*, 2001; Tong *et al.*, 2001). Les gènes *cyp19a* et *cyp19b* seraient donc des gènes orthologues, nés d'une duplication du gène *cyp19* apparue très tôt chez les poissons téléostéens (Chiang *et al.*, 2001).

Chez le poisson zèbre, l'analyse de la séquence des régions promotrices des gènes *cyp19a* et *cyp19b* montre des différences (Kazeto *et al.*, 2001; Kazeto *et al.*, 2003; Tong and Chung,

2003). La figure 3 présente les différents éléments de réponses retrouvés dans les régions promotrices des deux gènes chez le poisson zèbre.

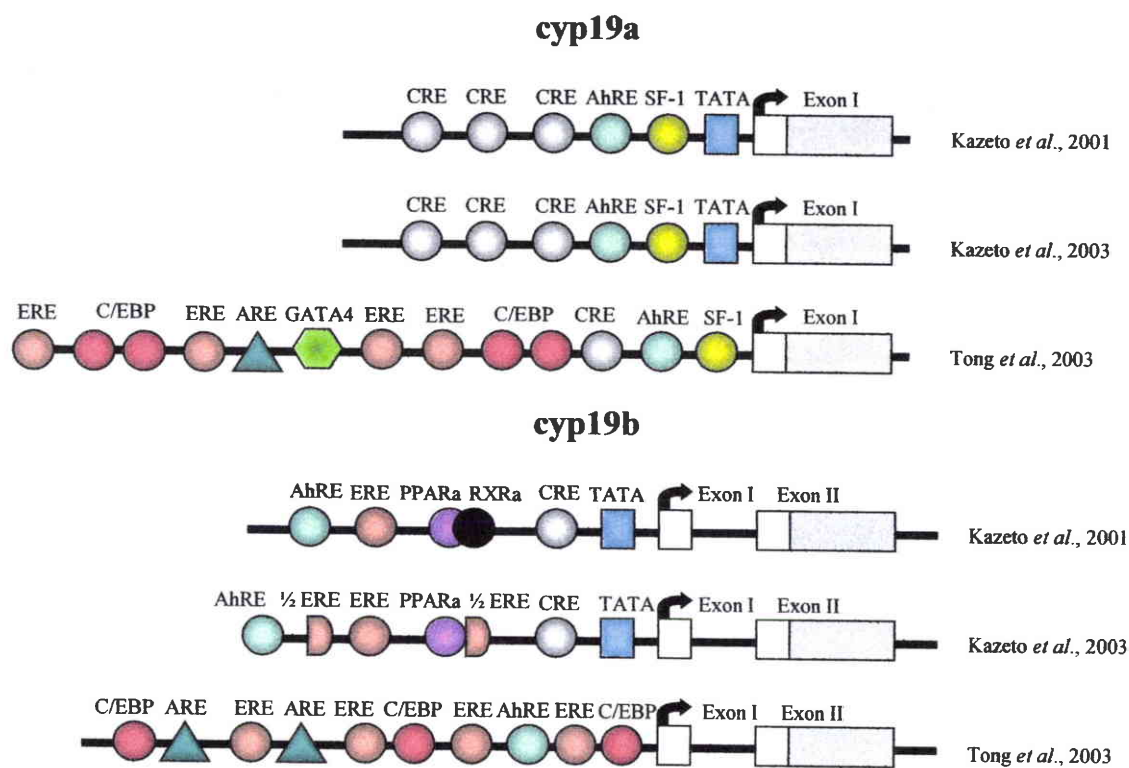


Figure 3 : Schéma des régions promotrices des gènes *cyp19a* et *cyp19b*, et de leurs potentiels éléments de réponses. AhRE : élément de réponse aux aryl hydrocarbures ; ARE : élément de réponse aux androgènes ; C/EBP : site de fixation à l'ADN de séquence CCAAT reconnu par l'EBP ; CRE : élément de réponse à l'AMP cyclique ; ERE : élément de réponse aux œstrogènes ; GATA4 : élément de réponse au facteur de transcription GATA4 ; PPAR $\alpha$  : élément de réponse aux récepteurs  $\alpha$  des proliférateurs des peroxyisomes ; RXR $\alpha$  : élément de réponse aux récepteurs  $\alpha$  des rétinoïdes X ; SF-1 : élément de réponse au facteur stéroïdogénique 1 ; TATA : boîte TATA. (modifié d'après Kazeto *et al.*, 2001; Kazeto *et al.*, 2003; Tong and Chung, 2003).

En fonction des publications, le nombre et la nature des éléments de réponse trouvés dans la région promotrice des deux gènes varient. La région promotrice du gène *cyp19a* révèle la présence d'un élément de réponse au facteur stéroïdogénique 1 (SF-1), d'un élément de réponse aux aryl hydrocarbures (AhRE), ainsi que d'un ou plusieurs éléments de réponse à l'Amine Mono Phosphate cyclique (AMPC) (CRE) (Kazeto *et al.*, 2001; Kazeto *et al.*, 2003; Tong and Chung, 2003). Tong et Chung (2003) sont les seuls à montrer également la présence



d'un élément de réponse aux œstrogènes (ERE), d'un élément de réponse aux androgènes (ARE), d'un élément de réponse au facteur de transcription GATA4 (GATA4), ainsi qu'un site de fixation à l'ADN de séquence CCAAT reconnu par l'EBP (C/EBP). En ce qui concerne la région promotrice du gène *cyp19b*, elle contient un ou plusieurs ERE, un AhRE, et un CRE. Kazeto *et al.* (2001, 2003) trouvent également un élément de réponse aux récepteurs  $\alpha$  des proliférateurs des péroxisomes (PPAR $\alpha$ ) ainsi qu'un élément de réponse aux récepteurs  $\alpha$  des rétinoïdes X (RXR $\alpha$ ). Tong et Chung (2003), quant à eux, ne trouvent ni PPAR $\alpha$  ni RXR $\alpha$ , mais des ARE et des C/EBP. Les différences observées dans les régions promotrices des deux gènes *cyp19a* et *cyp19b* laissent supposer que les régulations de ces deux gènes pourront être différentes.

Les régions promotrices des gènes *cyp19a* et *cyp19b* ont également été séquencées chez d'autres espèces de poissons. Les éléments de réponse retrouvés diffèrent entre les régions promotrices des deux gènes, mais également entre les différentes espèces. Le tableau I résume les différents éléments de réponses retrouvés chez le poisson rouge, le poisson chat, le medaka, le tilapia et la truite arc-en-ciel. Dans la région promotrice du gène *cyp19a* de ces espèces on retrouve des : AhRE, CRE,  $\frac{1}{2}$  ERE, FTZ-F1/SF-1, et éléments de réponse aux facteurs SRY et SOX (SRY/SOX). Dans la région promotrice du gène *cyp19b* on trouve des : ARE, C/EBP, ERE, FTZ-F1/SF-1, GATA2, éléments de réponse au facteur Nur77 (NBRE), éléments de réponse aux récepteurs des rétinoïdes X (RXR), et SRY/SOX.

Certains éléments de réponse communs à toutes les espèces apparaissent. En effet, tous les promoteurs des gènes *cyp19b* contiennent un ou plusieurs ERE et tous les promoteurs des gènes *cyp19a* contiennent des FTZ-F1 / SF-1.

Tableau I : Eléments de réponses présents dans les régions promotrices des gènes *cyp19a* et *cyp19b* chez le poisson rouge, le poisson chat, le medaka, le tilapia et la truite arc-en-ciel. AhRE : élément de réponse aux aryl hydrocarbures ; ARE : élément de réponse aux androgènes ; C/EBP : site de fixation à l'ADN de séquence CCAAT reconnu par l'EBP ; CRE : élément de réponse à l'AMP cyclique ; ERE : élément de réponse aux œstrogènes ; FTZ-F1/SF-1 : élément de réponse au facteur stéroïdogénique 1 ; GATA2 : élément de réponse au facteur de transcription GATA2 ; GATA4 : élément de réponse au facteur de transcription GATA4 ; NBRE : élément de réponse au facteur Nur77 ; PPAR : élément de réponse aux récepteurs des proliférateurs des péroxisomes ; RXR : élément de réponse aux récepteurs des rétinoïdes X ; SRY/SOX : élément de réponse aux facteurs SRY et SOX. X : présence de l'élément de réponse. P. : poisson.

Espèces		AhRE	ARE	C/EBP	CRE	ERE / ½ ERE	FTZ-F1/SF-1	GATA2	GATA4	NBRE	PPAR	RXR	SRY/SOX	Références
Cyp19a	P. rouge	X					X						X	(Callard <i>et al.</i> , 2001; Tchoudakova <i>et al.</i> , 2001)
	Tilapia				X	X	X							(Yoshiura <i>et al.</i> , 2003)
	Truite	X			X	X	X							(Kanda <i>et al.</i> , 2006)
Cyp19b	P. rouge			X		X		X		X		X	X	(Callard <i>et al.</i> , 2001; Tchoudakova <i>et al.</i> , 2001)
	P. chat		X			X								(Kazeto and Trant, 2005)
	Medaka					X	X			X			X	(Kuhl <i>et al.</i> , 2005.)

Bien que de nombreux éléments de réponse putatifs soient présents dans les régions promotrices des deux gènes, très peu de données sont disponibles sur la fonctionnalité de ces éléments de réponses.

Pour la région promotrice du gène *cyp19a*, aucune donnée sur la fonctionnalité des éléments de réponse n'est disponible chez le poisson zèbre. Toutefois, chez d'autres espèces de poissons téléostéens, deux éléments de réponses sont connus pour être fonctionnels. Chez le medaka, les gonadotropines induisent l'activité aromatasase dans les follicules en vitellogenèse *via* un mécanisme dépendant de l'AMPc (Nagahama *et al.*, 1991). D'autres études ont suggéré un rôle potentiel du FTZ-F1, dont la famille comprend le facteur SF-1, chez le medaka (Watanabe *et al.*, 1999), et du facteur Ad4BP/SF-1 chez le tilapia (Yoshiura *et al.*, 2003) dans l'induction de la transcription de l'aromatasase dans les follicules ovariens. Plus récemment, Kanda *et al.* (2006) ont montré que FTZ-F1 active la transcription du gène *cyp19a* dans les ovaires de truite.

Par ailleurs, l'exposition à l'oestradiol induit la transcription du gène *cyp19b* chez les larves de poissons zèbres (Kishida *et al.*, 2001). Au niveau moléculaire, il est clairement démontré que ces inductions nécessitent la fixation d'un ER activé sur les ERE et ½ ERE présents dans la région promotrice du gène (Menuet *et al.*, 2005).

Une caractéristique commune des gènes *cyp19a* et *cyp19b* chez le poisson zèbre est la présence de CRE et de AhRE dans leurs régions promotrices, suggérant une régulation potentielle de l'expression des deux gènes par l'AMPC mais également par des polluants capables d'interagir avec les AhR tels que les dioxines ou les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).

Contrairement au mammifères où la régulation de l'aromatase est tissu spécifique, chez les poissons, chaque gène possède son promoteur contenant différents éléments de réponse. Les informations concernant les régulations et la fonctionnalité de tous ces éléments de réponse sont encore partielles. Des études complémentaires sont donc nécessaires afin de compléter les données existantes.

### IV.3. Méthodes de mesure de l'expression des aromatasés

Différentes méthodes de mesures existent dans la littérature selon le niveau d'organisation cellulaire que l'on veut étudier (ARNm, protéine, activité enzymatique). Le tableau II présente différentes méthodes disponibles pour mesurer les expressions / activités aromatasés, avec leurs avantages et inconvénients majeurs.

Tableau II : Avantages et inconvénients des différentes méthodes de mesure des expressions et activités aromatasés.

Niveau de la mesure	Méthode	Avantages	Inconvénients
ARNm	PCR / RT-PCR		
	Northern-Blot	- spécifique du gène	- nécessite la séquence du gène
	ADN branché	- localisation cellulaire (HIS)	
	Hybridation in situ (HIS)		
Protéine	ELISA	- spécifique de la protéine	- nécessite la séquence de la protéine
	Western-Blot	- localisation cellulaire (ICC)	- nécessite un anticorps
	Immunocytochimie (ICC)		
Activités enzymatiques	Eau tritiée	- ne nécessite aucune séquence	- méthodes radioactives
	HPLC	(non spécifique de l'espèce)	
	Fluorimétrie		- peu spécifique de l'enzyme

A l'initiation de ce projet de thèse, la plupart des études réalisées chez le poisson utilisaient des méthodes de mesure de l'expression des gènes. En ce qui concerne les mesures de la synthèse protéique des aromatasés chez le poisson, seules deux études, réalisées chez le poisson crapaud à nageoires unies et la truite, avaient pu mettre en évidence la synthèse de la protéine aromatasé dans le cerveau (Forlano *et al.*, 2001; Menuet *et al.*, 2003). Certaines études de laboratoire plus anciennes (Pasmanik and Callard, 1985; Pasmanik and Callard, 1988; Monod *et al.*, 1993; Gonzalez and Piferrer, 2002), ainsi que certaines études de terrain (Noaksson *et al.*, 2001; Noaksson *et al.*, 2003) utilisaient également la méthode de l'eau tritiée pour les dosages d'activités enzymatiques.

Toutefois, à cette époque, aucune donnée relative aux activités aromatasés ni aucun anticorps anti-aromatasé n'étaient disponibles chez le poisson zèbre.

#### IV.4. Expression / activité aromatasé

##### IV.4.1 Expression / activité en fonction du tissu

Chez les mammifères, l'expression du gène *cyp19* a été mise en évidence principalement dans les gonades mais également dans de nombreux tissus tels que le cerveau, les muscles squelettiques, le placenta ou encore les tissus adipeux et osseux (Simpson *et al.*, 1994;

Lephart, 1996; Larionov *et al.*, 2003; EPA, 2005). Chez les poissons, l'expression des gènes de l'aromatase ainsi que les activités d'aromatation, prédominent dans le cerveau et les ovaires, mais sont également détectées dans de nombreux tissus : cerveau, ovaires, testicules, reins, foie, tissu adipeux, branchies, etc. Le tableau III synthétise les données concernant la répartition de l'expression des aromatasés en fonction des tissus et des diverses espèces.

Tableau III : Expression tissulaire de l'aromatase chez les poissons. Cyp19a :transcrits du gène cyp19a, cyp19b : transcrits du gène cyp19b, AA : activités aromatasés. + : présence, - : absence.

Espèce	Gène															Références
		Cerveaux	Ovaires	Testicules	Reins	Rates	Foies	Muscles	Tissus adipeux	Coeurs	Peau	Branchies	Yeux	Intestins	Sang	
Poisson zèbre	cyp19a	-	+	-			-	-					-		(Kishida and Callard, 2001)	
	cyp19b	+	-	-			-	-					+			
	cyp19a	+	+	-	-		-	-	+					+	(Chiang <i>et al.</i> , 2001)	
	cyp19b	+	-	-	-		-	-	-					-		
	cyp19a	+	+	+									+		(Sawyer <i>et al.</i> , 2006)	
	cyp19b	+	+	+									+			
Dorade royale	cyp19a	+	+	+	+	+	-	-	+		+	+	+	+	(Wong <i>et al.</i> , 2006)	
Flet	cyp19a	+	+	-	-	+	+	-	-		+		-		(Luckenbach <i>et al.</i> , 2005)	
Gobie	cyp19a	+	+	+	-	+	-								(Kobayashi <i>et al.</i> , 2004)	
	cyp19b	+	+	+	-	-	+									
Loup de mer	cyp19a	-	+	+	-	-	-		-		-				(Blazquez and Piferrer, 2004)	
	cyp19b	+	+	+	+	-	-		-		-					
Poisson chat	cyp19	+	+	-	-		-								(Trant <i>et al.</i> , 1997)	
Poisson killi	cyp19a	-	+	-		-	-	-	-		-	-	-		(Greytak <i>et al.</i> , 2005)	
	cyp19b	+	+	-		-	-	-	-		-	+	-			
Tilapia	cyp19a	+	+	+	+	+	-	+	+		+		+	+	(Chang <i>et al.</i> , 2005)	
	cyp19b	+	+	+	+	+	-	+	+		+		+	+		
	cyp19a	+	+	+	-	+	-						-		(Kwon <i>et al.</i> , 2001)	
	cyp19b	+	+	+	+	-	-									
Truite	cyp19a	+	+				-				-				(Dalla Valle <i>et al.</i> , 2002)	
	cyp19b	+	+				-				-					

Chez les poissons, il existe une expression différentielle des gènes *cyp19a* et *cyp19b* dans les cerveaux et les gonades. Chez le poisson zèbre comme chez d'autres espèces de poissons téléostéens, le gène *cyp19a* est majoritairement exprimé dans les ovaires et le gène *cyp19b* est majoritairement exprimé dans le cerveau (Gelinas *et al.*, 1998; Tchoudakova and Callard, 1998; Callard *et al.*, 2001; Sawyer *et al.*, 2006; Villeneuve *et al.*, 2006). Dans les testicules, les données sont contradictoires. Des études montrent que, chez le poisson zèbre et le tilapia, c'est le gène *cyp19b* qui est majoritairement exprimé dans les testicules (Chang *et al.*, 2005; Sawyer *et al.*, 2006). En revanche, l'étude de Fenske et Segner (2004) montre une expression du gène *cyp19a* légèrement supérieure à celle du gène *cyp19b* dans les testicules de poissons zèbres. Par ailleurs, les niveaux d'expression des ARNm du gène *cyp19b* dans le cerveau des poissons, sont supérieurs à ceux des ARNm du gène *cyp19a* dans les gonades (Dalla Valle *et al.*, 2002; Halm *et al.*, 2002; Sawyer *et al.*, 2006; Villeneuve *et al.*, 2006).

Contrairement aux mammifères, les poissons présentent des activités aromatasés cérébrales exceptionnelles. Par exemple, l'activité aromatasé dans l'aire pré-optique de l'hypothalamus chez le poisson rouge est 100 à 1000 fois plus importante que dans la région correspondante chez le rat, la souris, le lapin ou l'homme (Pasmanik and Callard, 1988).

De plus, les activités aromatasés mesurées au niveau du cerveau des poissons sont plus importantes que les activités mesurées dans les gonades (Tableau IV). Le tableau IV synthétise les données d'activités aromatasés cérébrales et gonadiques de différentes espèces de poissons.

Il est intéressant de noter qu'aucune étude ne met en évidence d'activité aromatasé dans les testicules, bien que les gènes *cyp19* soient exprimés dans ce tissu.

De plus, les activités aromatasés varient d'une espèce à une autre mais également d'une étude à une autre sur la même espèce. Par exemple, chez le vairon à tête de boule, les différentes études donnent des activités d'aromatation allant de 1.7 à 12500 fmol/mg/min dans le cerveau. Chez le poisson zèbre, la plupart des études se sont intéressées à l'expression des gènes *cyp19*, et il existe très peu d'information concernant les activités aromatasés. Les seules études donnant des informations sur les activités aromatasés chez le poisson zèbre sont celles de Andersen *et al.* (2003, 2004, 2006). Toutefois, les données sont très variables selon l'étude allant de 250 à 3333 fmol/mg/min dans le cerveau des mâles (Andersen *et al.*, 2004; Andersen *et al.*, 2006) ou sont exprimées dans des unités de mesures ne permettant aucune comparaison (pmol/cerveau/heure) (Andersen *et al.*, 2003).

Tableau IV : Niveaux d'activités aromatasés dans les cerveaux et les ovaires de poissons adultes. AA : activités aromatasés.

Espèce	Sexe	Tissu	Fraction	AA (fmol/mg/min)	Référence
Loup de mer	Mâles	Cerveaux	homogénats	133	(Gonzalez and Piferrer, 2003)
	Femelles	Cerveaux	homogénats	100	(Gonzalez and Piferrer, 2003)
	Femelles	Ovaires	homogénats	9.8	(Gonzalez and Piferrer, 2003)
Medaka	Mâles	Cerveaux	homogénats	0.166	(Contractor <i>et al.</i> , 2004)
	Femelles	Cerveaux	homogénats	0.75	(Contractor <i>et al.</i> , 2004)
Pagre tête noire	Femelles	Ovaires	homogénats	10-120	(Lee <i>et al.</i> , 2000)
Poissons rouges	Femelles	Cerveaux	homogénats	116-1000	(Pasmanik and Callard, 1988)
	Femelles	Ovaires	homogénats	20-100	(Pasmanik and Callard, 1988)
Poisson zèbre	Mâles	Cerveaux	/	3333	(Andersen <i>et al.</i> , 2004)
	Mâles	Cerveaux	S9	250	(Andersen <i>et al.</i> , 2006)
Truite	Femelles	Ovaires	microsomes	30-60	(Shilling <i>et al.</i> , 1999)
Vairons à tête de boule	Mâles	Cerveaux	S9	1.7	(Ankley <i>et al.</i> , 2002)
	Femelles	Cerveaux	S9	1.9	(Ankley <i>et al.</i> , 2002)
	Mix	Cerveaux	S9	12500*	(Hornung <i>et al.</i> , 2004)
	Femelles	Ovaires	microsomes	6	(Hornung <i>et al.</i> , 2004)
	Femelles	Cerveaux	S9	66-83	(Villeneuve <i>et al.</i> , 2006)
	Femelles	Ovaires	S9	0.3-1.6	(Villeneuve <i>et al.</i> , 2006)

\* dans cette étude les cerveaux de poissons mâles et femelles ont été regroupés.

#### IV.4.2 Répartition tissulaire et localisation cellulaire des expressions

Chez le poisson zèbre, le gène *cyp19b* est principalement exprimé dans le cerveau antérieur notamment dans les bulbes olfactifs, le télencéphalon, l'aire préoptique mais également dans l'hypothalamus (Chiang *et al.*, 2001; Goto-Kazeto *et al.*, 2004), ce qui correspond au profil d'expression de la protéine P450<sub>aroB</sub> chez cette espèce (Menuet *et al.*, 2005). La figure 4 présente sur un schéma et une photo de cerveau de poisson zèbre, les différentes zones citées précédemment. Aucune différence n'a été observée dans les profils d'expression du gène *cyp19b* entre les mâles et les femelles (Tong *et al.*, 2001), ni dans l'expression de la protéine aromatasé B (distribution similaire) (Menuet *et al.*, 2005).

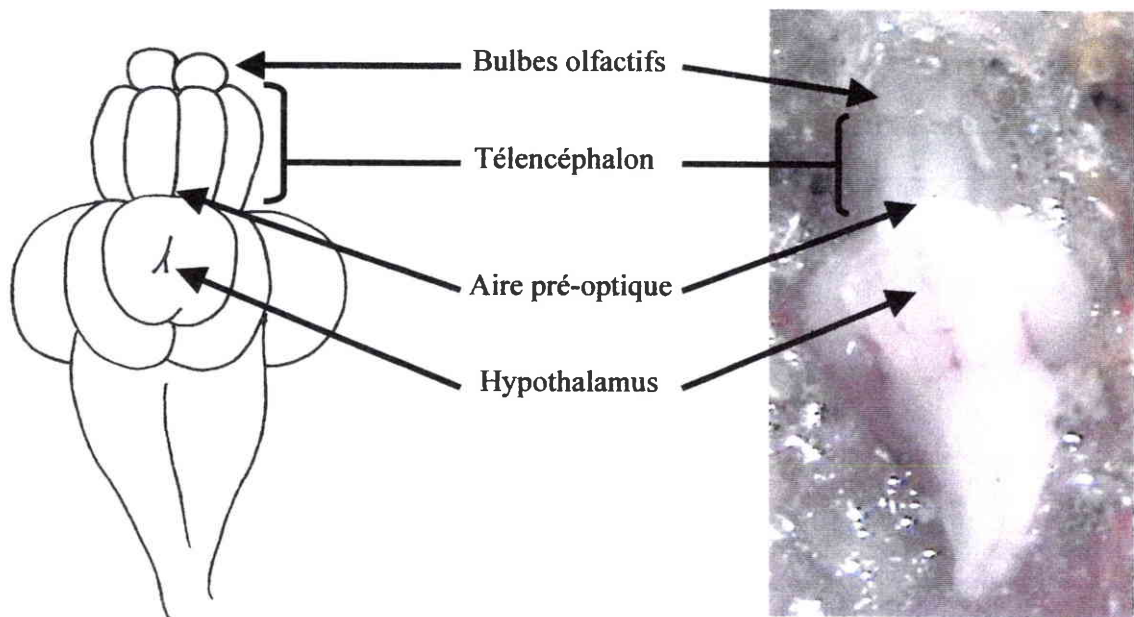


Figure 4 : Représentation schématique et photographie d'un cerveau de poisson zèbre en vue ventrale.

Contrairement aux mammifères et aux oiseaux où l'aromatase cérébrale est exprimée dans les neurones, chez la truite et le poisson crapaud à nageoires unies, l'aromatase cérébrale est exprimée dans les cellules gliales radiaires (Forlano *et al.*, 2001; Menuet *et al.*, 2003). Ces mêmes cellules sont à l'origine de l'expression de l'aromatase dans le cerveau de poisson zèbre (Menuet *et al.*, 2005).

Dans les gonades femelles, les techniques d'hybridation *in situ* ont permis de mettre en évidence une expression du gène *cyp19a* dans les cellules de la thèque et de la granulosa, autour des ovocytes vitellogéniques (Chiang *et al.*, 2001; Goto-Kazeto *et al.*, 2004; Kobayashi *et al.*, 2004; Rodriguez-Mari *et al.*, 2005). Dans les gonades mâles, le gène *cyp19a* est exprimé dans les cellules intersticielles des testicules matures chez les gobies (Kobayashi *et al.*, 2004). En revanche, chez le poisson zèbre, aucune expression du gène *cyp19a* n'est détectée dans les testicules (Rodriguez-Mari *et al.*, 2005), suggérant que le gène *cyp19a* n'est peut être pas le gène majoritairement exprimé dans les testicules chez cette espèce. A notre connaissance, il n'y a actuellement aucune donnée disponible sur les cellules à l'origine de l'expression du gène *cyp19b* dans les gonades chez les poissons. Toutefois, une étude réalisée chez la truite montre que différentes enzymes de la stéroïdogenèse (P450 11A, P450c17 et 3-



$\beta$ -HSD) sont synthétisées dans les cellules de Leydig des testicules (Kobayashi *et al.*, 1998). Des études menées actuellement au laboratoire sur le poisson zèbre mettent également en évidence la synthèse de P450c17 dans le tissu intersticiel des testicules. Il est de ce fait probable que l'aromatase B soit synthétisée par ces mêmes cellules dans les testicules.

#### *IV.4.3 Expression / activité au cours du développement*

Chez les poissons, l'expression des aromatasés débute très précocement au cours du développement. Chez le poisson zèbre, Kishida et Callard (2001) ont montré une expression embryonnaire des gènes *cyp19a* et *cyp19b* qui a lieu à partir de 12-24 heures post fertilisation (hpf). Le profil d'expression des gènes *cyp19a* et *cyp19b* dans l'embryon de poisson zèbre se caractérise par une accumulation des ARNm de P450aroA et B jusqu'au stade larvaire (120 hpf), avec une accumulation plus importante des ARNm de P450aroB. Ensuite, l'expression des gènes *cyp19a* et *cyp19b* varie de façon dynamique au cours du développement et de la croissance des larves (Trant *et al.*, 2001). De plus, il semblerait que l'expression du gène *cyp19b* soit sexuellement dimorphique chez les larves de poissons zèbres (Trant *et al.*, 2001). Chez le rivulus, l'expression des gènes *cyp19a* et *b* est également précoce, dès 2 jours post fertilisation (jpf), et varie au cours du développement avec une expression plus importante du gène *cyp19b* que du gène *cyp19a* (Lee *et al.*, 2006). Chez la truite, il existe aussi une expression précoce de l'aromatase dans les gonades indifférenciées histologiquement des mâles et des femelles avec une expression 100 fois plus importante dans les gonades femelles que dans les gonades mâles (Guiguen *et al.*, 1999). Chez le tilapia, on observe un profil d'expression similaire dans les gonades indifférenciées de mâles et de femelles avec une expression prédominante dans les gonades femelles (D'Cotta *et al.*, 2001). Chez cette même espèce, une étude plus récente montre que le gène *cyp19b* est exprimé dans les gonades chez les deux sexes, et que c'est plus particulièrement l'expression du gène *cyp19a* qui est dimorphique puisqu'il n'est exprimé que dans les gonades chez les femelles (Chang *et al.*, 2005). Chez cette espèce, le dimorphisme sexuel de l'expression des aromatasés gonadiques au cours de la différenciation s'observe aussi au niveau cérébral avec des activités aromatasés plus importantes dans les cerveaux des femelles (D'Cotta *et al.*, 2001).

#### IV.4.4 Expression / activité au cours du cycle reproducteur

Chez les poissons, les niveaux d'expression et d'activité des aromatasés cérébrales et gonadiques fluctuent au cours du cycle reproducteur.

Chez des poissons à cycle de reproduction annuel tels que le poisson chat, la dorade japonaise ou encore la truite, l'expression du gène *cyp19a* dans les ovaires fluctue en fonction du stade de développement des ovocytes. Les transcrits de *cyp19a* sont abondants dans les ovaires durant la vitellogenèse mais sont peu abondants ou absents dans les ovaires en période de pré-vitellogenèse ou de maturation ovocytaire (Tanaka *et al.*, 1992; Trant *et al.*, 1997; Sampath Kumar *et al.*, 2000; Gen *et al.*, 2001). Au niveau enzymatique, des profils similaires sont observés dans les ovaires chez le poisson rouge, suggérant un contrôle transcriptionnel des activités enzymatiques au niveau des gonades (Pasmanik and Callard, 1988). Ces observations sont à mettre en relation avec la production d'œstradiol dans les follicules durant la vitellogenèse et la diminution rapide des concentrations en œstradiol avant la maturation finale des ovocytes observée chez de nombreuses espèces (Tanaka *et al.*, 1992; Gen *et al.*, 2001).

Chez les poissons à cycles de reproduction courts tels que le medaka, le gobie ou le poisson zèbre, ces fluctuations d'expression / activité aromatasé au niveau des ovaires sont plus difficiles à mettre en évidence. Toutefois, chez des espèces présentant un intérêt pour les expérimentations en toxicologie et écotoxicologie telles que le medaka et le poisson zèbre, des fluctuations ont pu être mise en évidence en fonction du stade de développement des follicules ovariens. De manière similaire aux poissons à cycle annuel, les transcrits de *cyp19a* sont abondants dans les follicules durant la vitellogenèse mais sont peu abondants ou absents dans les follicules en période de pré-vitellogenèse ou de maturation ovocytaire (Fukada *et al.*, 1996; Chiang *et al.*, 2001; Goto-Kazeto *et al.*, 2004; Kobayashi *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2005; Rodriguez-Mari *et al.*, 2005).

Contrairement aux fluctuations d'expression / activité aromatasé qui sont relativement bien décrites dans les ovaires notamment des espèces à cycle de reproduction annuel, très peu de données sont disponibles sur les fluctuations d'expression / activité aromatasé dans les testicules. Chez le vairon à tête de boule, le taux de transcrits de *cyp19b* dans les testicules diminue quand l'état de maturité du poisson, mesuré par l'index gonado-somatique (GSI), augmente (Halm *et al.*, 2002). En revanche, chez le gobie, le taux de transcrits de *cyp19a*

semble augmenter avec la maturité du poisson puisque les transcrits ne sont détectés que dans les testicules matures (Kobayashi *et al.*, 2004).

Dans le cerveau, des fluctuations d'expression du gène *cyp19b* ont été mises en évidence chez le poisson zèbre et le poisson chat au cours du cycle reproducteur (Kazeto *et al.*, 2003) ainsi que des fluctuations d'expression du gène *cyp19a* chez le tambour brésilien (Nunez and Applebaum, In press). Des fluctuations au niveau des activités aromatasés cérébrales chez le poisson rouge et chez le loup de mer au cours du cycle reproducteur ont également été mises en évidence (Pasmanik and Callard, 1988; Gonzalez and Piferrer, 2003). Chez ces espèces, les expressions / activités aromatasés dans le cerveau atteignent un maximum durant la période de reproduction suggérant un besoin croissant en œstrogènes dans le cerveau (Nunez and Applebaum, In press; Gonzalez and Piferrer, 2003).

## IV.5. Rôle physiologique de l'aromatase

### IV.5.1 Aromatase et neurogenèse

Comme nous l'avons vu précédemment, l'aromatase cérébrale est exprimée dans les cellules gliales radiaires du cerveau chez trois espèces de poissons différentes : le poisson crapaud à nageoires unies, la truite et le poisson zèbre. Contrairement aux mammifères où, dans les conditions normales d'expression, l'aromatase s'exprime dans les neurones, chez le poisson crapaud à nageoires unies et le poisson zèbre, aucune expression aromatasé n'est détectée dans les neurones et les axones (Forlano *et al.*, 2001; Pellegrini *et al.*, In press).

Les cellules gliales radiaires sont des cellules possédant un petit noyau près de la surface ventriculaire du cerveau, un court prolongement dans le ventricule et de longues extensions radiaires se terminant par un pied près de la surface du cerveau. Chez les mammifères et les oiseaux, ces cellules sont connues pour guider la migration des neurones des zones ventriculaires jusqu'aux zones plus profondes du cerveau (Parnavelas and Nadarajah, 2001). Des études récentes indiquent que, chez les mammifères, les cellules gliales radiaires donnent naissance, par division asymétrique, aux neurones qui ensuite utilisent les extensions radiaires pour migrer vers les zones plus profondes du cerveau et qu'elles pourraient agir comme des acteurs clés dans la différenciation région-spécifique du cerveau (Campbell and Gotz, 2002; Noctor *et al.*, 2002; Anthony *et al.*, 2004).

Les poissons téléostéens présentent la particularité d'avoir une neurogenèse continue tout au long de leur vie. Chez les poissons adultes, les zones prolifératrices périventriculaires (Zupanc, 2001; Lema *et al.*, 2005; Zupanc *et al.*, 2005; Zupanc, 2006) semblent bien correspondre aux zones d'expression de l'aromatase (Forlano *et al.*, 2001; Menuet *et al.*, 2003; Menuet *et al.*, 2005). De plus, l'œstradiol est bien connu pour ses effets neurotrophiques, neuroprotecteurs et organisationnels au niveau du cerveau chez les mammifères (Behl, 2002). L'ensemble de ces données suggère qu'il est possible que l'aromatase (ou plus particulièrement la production locale d'œstrogènes) module la neurogenèse chez les poissons adultes (Pellegrini *et al.*, 2005).

#### *IV.5.2 Aromatase et comportement*

Chez les mammifères, des modèles de souris présentant une mutation ou une délétion au niveau du gène de l'aromatase ont été développés (souris ArKO). Ces souris ArKO présentent des altérations du comportement reproducteur. En effet, les mâles ArKO présentent une fertilité réduite, une diminution des comportements de monte, d'intromission et d'éjaculation ainsi qu'une réduction de l'agressivité envers les autres mâles (Matsumoto *et al.*, 2003). Les femelles ArKO présentent, quant à elles, une altération de leur comportement de recherche d'odeurs (Bakker *et al.*, 2002).

Chez les poissons, au niveau du cerveau, l'aromatase semble également jouer un rôle dans le comportement des individus. En effet, chez le gobie à bandes bleues, les femelles présentent des activités aromatasés cérébrales plus élevées que les mâles, mais durant les quelques minutes à quelques heures que dure le changement de sexe (passage du sexe femelle au sexe mâle), l'augmentation significative de l'agressivité coïncide parfaitement avec l'inhibition drastique des activités aromatasés dans le cerveau (Black *et al.*, 2005). Une seconde étude récente montre également une diminution de certains comportements reproducteurs (lors de la cour), chez des guppys mâles exposés au fadrozole et présentant une réduction de l'activité aromatase cérébrale (Hallgren *et al.*, 2006).

#### IV.5.3 Aromatase, reproduction et différenciation sexuelle

Chez les mammifères, des études menées sur des souris ArKO mâles montrent que les individus présentent une réduction du poids des testicules ainsi qu'une perturbation de la spermatogenèse augmentant avec l'âge et altérant leur fertilité (Carreau *et al.*, 2002; Murata *et al.*, 2002). Ils présentent également des taux élevés de testostérone et d'hormone luthéïnisante. Les femelles portant ce type de mutation présentent des ovaires et des utérus sous-développés, avec le plus souvent une absence de *corpora lutea* (masse de cellules sécrétrices de progestérone qui se forme à partir du follicule ovarien après la mise bas) (Fisher *et al.*, 1998). Leur taux de testostérone est plus élevé que la normale, mais également ceux d'hormone luthéïnisante et d'hormone folliculostimulante.

De plus, chez les souris ERKO (souris avec une délétion au niveau d'un ou de plusieurs gènes codant pour les récepteurs des œstrogènes) les femelles sont acycliques, stériles et présentent des ovaires dépourvus de *corpora lutea* et les mâles se caractérisent par une atrophie testiculaire qui entraîne une diminution de la spermatogenèse et de la qualité du sperme, et sont stériles (Fisher *et al.*, 1998).

L'ensemble de ces résultats montre que les œstrogènes et l'aromatase tiennent un rôle essentiel dans la physiologie et plus particulièrement dans la reproduction des femelles et des mâles chez les mammifères.

Chez les poissons, il n'existe aucun modèle présentant ce type de mutation ou délétion au niveau des gènes de l'aromatase. Toutefois, l'aromatase semble jouer un rôle important dans le processus de différenciation sexuelle.

La différenciation sexuelle est définie comme étant le développement de testicules ou d'ovaires à partir d'une gonade indifférenciée. Chez les poissons, certaines espèces possèdent une détermination du sexe liée à des chromosomes, comme chez les mammifères. Chez certains salmonidés, les mâles sont hétérogamétiques et les femelles homogamétiques, système similaire au système XY/XX des mammifères (Thorgaard, 1977; Thorgaard, 1978; Phillips and Ihssen, 1985). Chez certaines espèces de la famille des Poeciliidés, les mâles sont homogamétiques et les femelles hétérogamétiques (ZZ/ZW) (Volf and Scharl, 2001). Chez d'autres espèces telles que le poisson zèbre, il n'a pas été possible de mettre en évidence de chromosomes sexuels. Toutefois, même chez les espèces possédant des chromosomes sexuels, la différenciation sexuelle est particulièrement sensible aux facteurs environnementaux tels

que la température, le pH, et les xénobiotiques ou encore aux facteurs sociaux (Baroiller *et al.*, 1999; Baroiller and D'Cotta, 2001).

Chez la truite, il semblerait que ce soit l'induction de l'aromatase et du cytochrome P450c11 dans la gonade qui permette la différenciation en ovaire et en testicule respectivement (Baron and Guiguen, 2003), en revanche chez le tilapia, ce serait la répression de l'aromatase qui permettrait la différenciation de la gonade en testicule (Kwon *et al.*, 2001). Chez le poisson zèbre, le gène *cyp19a* est exprimé dans les gonades indifférenciées mais ne l'est plus dans les testicules (Rodriguez-Mari *et al.*, 2005). Il est donc possible que chez le poisson zèbre, comme chez le tilapia, ce soit une répression de l'aromatase qui soit à l'origine de la différenciation de la gonade en testicule.

Lors de l'exposition de poissons à des inhibiteurs d'aromatase, la différenciation sexuelle peut s'en trouver altérée. Après une exposition de poissons juvéniles de poissons zèbres, de poissons lapins dorés ou de flets au fadrozole, un inhibiteur d'aromatase, on observe une masculinisation des individus, concomittante avec une inhibition de l'expression des aromatasés dans les gonades (Kitano *et al.*, 2000; Fenske and Segner, 2004; Uchida *et al.*, 2004; Komatsu *et al.*, 2006). Chez les femelles de flets exposées à du tributyl étain (TBT) on observe une réorientation de la différenciation gonadique vers un phénotype mâle (Shimasaki *et al.*, 2003). Pareillement, chez la truite, l'inhibition de l'expression de l'aromatase chez des femelles indifférenciées histologiquement peut se traduire par une modification de l'expression phénotypique du sexe (Guiguen *et al.*, 1999; Govoroun *et al.*, 2001). Chez le poisson zèbre, l'étude de Fenske et Segner (2004) montre que la différenciation sexuelle de la gonade semblerait dépendre du ratio entre les œstrogènes et les androgènes. L'ensemble de ces résultats indique donc que l'aromatase est une enzyme clé dans le processus de différenciation sexuelle chez les poissons.

Des études réalisées chez le flet, ainsi que chez le tilapia montrent également que le traitement de larves ou de juvéniles génétiquement femelles avec la méthyltestostérone entraîne le développement d'un phénotype mâle et réprime l'expression de l'aromatase (Kitano *et al.*, 2000; Bhandari *et al.*, 2006). De la même façon, chez le loup de mer une exposition à la méthyltestostérone masculinise les individus (Blazquez *et al.*, 2001). Dans cette dernière étude, Blazquez *et al.* (2001) montrent que la masculinisation des individus dépend de la concentration d'exposition, du temps d'exposition mais surtout de la période d'exposition. La période critique chez cette espèce coïncide avec la période de prolifération rapide des cellules germinales primordiales dans la gonade indifférenciée (Blazquez *et al.*, 2001). Toutefois, il reste à déterminer si la différenciation des gonades indifférenciées en testicules est due à

l'absence d'aromatase ou à la présence d'un androgène. Des données récentes montrent que chez les medaka adultes exposés à une molécule mimétique d'œstrogènes, le o,p'-DDT, une inhibition de l'aromatase par le fadrozole n'empêche pas la féminisation des poissons (Kuhl and Brouwer, 2006). Ceci suggère que l'aromatase ne serait pas un facteur décisif dans les changements de sexe aux stades adultes.

## IV.6. Perturbations de l'aromatase

### IV.6.1 Etudes de laboratoire

#### IV.6.1.1. Etudes *in vitro*

Des études toxicologiques ont démontré la capacité de certaines substances chimiques à moduler les activités d'aromatation *in vitro* et *in vivo* en induisant ou en inhibant les expressions / activités aromatasases.

Il existe différents types de modèles *in vitro* permettant d'étudier l'impact des substances sur les expressions / activités aromatasases : les modèles acellulaires (microsomes) et les modèles cellulaires (cultures primaires, lignées cellulaires). La majorité des modèles utilisés sont des modèles humain car il existe peu de modèles poissons. Dans ces essais, différentes méthodes sont utilisées pour déterminer les expressions / activités aromatasases : des méthodes directes de mesure de l'expression des gènes ou des activités aromatasases, et des mesures indirectes par quantification des stéroïdes formés par la réaction d'aromatation. Classiquement, la méthode de mesure la plus utilisée pour la réalisation de criblage de molécules est la mesure des activités aromatasases.

De nombreuses substances, présentes dans l'environnement aquatique, sont capables d'inhiber les activités d'aromatation *in vitro*. Ce sont, par exemple, certains pesticides comme l'imazalil, le prochloraz ou encore le propiconazole, le tributyl étain ou des substances naturelles telles que les phyto-œstrogènes isoflavoniques. D'autres molécules induisent les activités aromatasases. C'est le cas de certains pesticides tels que l'atrazine ou encore le bénomyl.

Des exemples de molécules capables de moduler les activités aromatasés *in vitro* dans différents modèles sont présentés dans le tableau V. La majorité des effets observés sont des effets inhibiteurs, quelque soit la classe de composés étudiée. Toutefois, les effets de toutes ces molécules peuvent parfois s'avérer différents selon le type de modèle utilisé (microsomes ou cellules ; cellules KGN ou H295R ou R2C...). Certains flavonoïdes, par exemple, présentent des effets différents en microsomes et en cellules. C'est le cas de la flavanone qui inhibe les activités aromatasés dans les microsomes de placenta humain mais n'a aucun effet sur l'aromatase dans les cellules KGN. Inversement, la génistéine n'a aucun effet sur l'aromatase dans les microsomes de placenta humain mais induit les activités aromatasés dans les cellules H295R, suggérant un mécanisme de régulation transcriptionnel. Certaines substances présentent également des effets différents lorsqu'elles sont testées dans des modèles cellulaires différents. On peut citer l'exemple de l'atrazine, la simazine et la vinclozoline, qui induisent les activités aromatasés dans les cellules H295R, mais pas dans les cellules KGN. Ces différences pourraient être liées au fait que ces deux lignées cellulaires proviennent de tissus différents. En effet les cellules KGN proviennent de tumeurs d'ovaires humains et les H295R proviennent de carcinomes adrenocorticaux humains. Chez l'homme les régulations du gène *cyp19* sont tissus dépendentes, de ce fait, les régulations de ces deux types cellulaires peuvent être différentes. L'ensemble de ces études montre donc l'importance et l'influence du test de criblage choisi sur les effets obtenus.

Les substances les plus actives restent les inhibiteurs synthétisés dans le but d'inhiber spécifiquement l'aromatase notamment pour des visées thérapeutiques dans le traitement de certains cancers hormonaux dépendants. En raison de leur utilisation thérapeutique, on peut s'interroger sur l'occurrence environnementale de ces molécules, qui sont capables d'inhiber de manière aspécifique les aromatasés chez l'humain mais aussi les aromatasés de poissons (Shilling *et al.*, 1999). Ce sont des molécules telles que l'aminoglutéthimide, le letrozole, l'anastrozole, et les inhibiteurs stéroïdiens tels que le 1,4,6-androtatrien-3,7-dione (ATD), et la 4-hydroxyandrostenedione (4OHA) (Rabe *et al.*, 1982; Shilling *et al.*, 1999). Ces substances se fixent au site actif de l'enzyme (inhibiteurs stéroïdiens) ou entrent en interaction avec le groupement prosthétique de l'hème (aminoglutéthimide) (Harada *et al.*, 1999; Seralini and Moslemi, 2001).



Tableau V : Effets de molécules perturbatrices endocriniennes sur l'expression des gènes de l'aromatase et sur les activités aromatasés dans différents modèles. 4-OHA : 4-hydroxyandrosténédione ; AA : activité aromatasé ; Aro : aromatasé ; ATD : androstatriènedione ; B[a]P : benzo[a]pyrène ; IC50 : concentration de substance nécessaire pour observer 50% d'effet ; Ki : constante d'inhibition ; P,p'-DDT : P,p'-dichlorodiphényltrichloroéthane ; PCB : polychlorobiphényles ; PCP : pentachlorophénols ; µS : microsomes.

Classe de molécule	Molécule	Effet sur AA dans les tests	Effet sur AA dans les tests	
		microsomes	cellulaires	
<b>Inhibiteurs stéroïdiens</b>	4-OHA	↘ 1,2,3	↘ 4,5,6	
	ATD	↘ 7		
<b>Inhibiteur non stéroïdien</b>	Aminogluthetimide	↘ 1,2,7,8,9,10	↘ 4,5,6,8,11,12	
<b>Inhibiteurs</b>	CGS 18320 B	↘ 13		
	Fadrozole	↘ 13,14	↘ 5,11,15	
<b>Stéroïdes</b>	Androsténédione	↘ 2		
	Dexamethasone		↗ 15 SE 15	
	Oestradiol	↘ 2		
	Oestrone	↘ 2		
	Testostérone	↘ 2		
<b>I / organochlorés</b>	Heptaclor		↗ 16	
	P,p'-DDT		↘ 4 SE 16	
<b>I / pyrèthrinolide</b>	Cyperméthrine		↘ 16	
<b>I / roténoïde</b>	Rotenone		↘ 17	
<b>H / chlorotriazine</b>	Atrazine		↗ 15, 18,19,20 SE 15,16	
	Simazine		↗ 17 SE 16	
<b>H / triazine</b>	Metribuzine		↘ 16	
	Propazine		↗ 17	
<b>F / benzimidazole</b>	Benomyl		↗ 4,16	
<b>F / dicarboximide</b>	Vinclozoline		↗ 20 SE 4,16	
<b>F / imidazole</b>	Bifonazole*	↘ 14		
	Clotrimazole*	↘ 14,21		
	Fluconazole*	↘ 14		
	Imazalil	↘ 3,14,21	↘ 4,20	
	Ketoconazole*	↘ 2,14,21	↘ 11,12	
	Miconazole*	↘ 14		
	Prochloraz	↘ 3,14,21	↘ 11,15,20	
	<b>F / pyrimidine</b>	Fenarimol	↘ 3,8	↘ 4,20
	<b>F / triazole</b>	Anastrozole*	↘ 13	
		Bitertanol	↘ 14	
Cyproconazole		↘ 14		
Diclobutrazole			↘ 4 ↗ 20	
Difenoconazole			↘ 20	
Epoxyconazole		↘ 14	↘ 15	
Flusilazole		↘ 14		
Hexaconazole		↘ 14	↘ 20	
Itraconazole*		↘ 14		
Letrozole*		↘ 1,13,14		

Classe de molécule	Molécule	Effet sur AA dans les tests	
		microsomes	cellulaires
F / triazole	Myclobutanil	↘ 14	
	Penconazole	↘ 14	↘ 20
	Propiconazole	↘ 3,14	↘ 4,20
	Tebuconazole	↘ 14	↘ 20
	Triadimefon	↘ 14	↘ 3,4
	Triadimenol	↘ 14	↘ 3
	Voriconazole*	↘ 14	
F / non classé	Tricyclazole		↗ 20
E / triazole	Paclobutrazole		↗ 20
Flavonoïdes	7,4'-Dihydroxyflavone	↘ 7	
	7,8-Dihydroxyflavone	↘ 10	
	7-Hydroxyflavanone		↘ 17
	7-Hydroxyflavone	↘ 10	↘ 4,17
	7-Methoxyflavone	↘ 10	↘ 4 SE 17
	Alpha-naphtoflavone	↘ 2,7	↘ 4
	Apigénine	↘ 7,10	↘ 4,17
	Chrysin	↘ 2,10	↘ 4,17
	Flavanone	↘ 7	ne 4
	Flavone	↘ 7,10	↘ 4 ↗ 17
	Génistéine	SE 10	↗ 17
	Naringénine	↘ 2,10	↘ 4,17
	Quercétine	↘ 7	↗ 17
	HAP	Benzo[a]pyrène	
Chrysène			↘ 12
Phénanthrène			↘ 12
PCB métabolites	3-132, 4-132, 4-149, 4-91		↘ 23
Autres	Bisphénol A		↘ 16
	Pentachlorophénol		↘ 16
	Tributyl étain		↘ 4,16,24

1 (Shilling *et al.*, 1999), 2 (Stresser *et al.*, 2000), 3 (Vinggaard *et al.*, 2000), 4 (Ohno *et al.*, 2004), 5 (Yue and Brodie, 1997), 6 (Zhao *et al.*, 2001), 7 (Pelissero *et al.*, 1996), 8 (EPA, 2005), 9 (Le Bail *et al.*, 1998), 10 (Le Bail *et al.*, 2000), 11 (Hecker *et al.*, In press a), 12 (Monteiro *et al.*, 2000a), 13 (Odum and Ashby, 2002), 14 (Trosken *et al.*, 2004), 15 (Heneweer *et al.*, 2004), 16 (Morinaga *et al.*, 2004), 17 (Sanderson *et al.*, 2004), 18 (Sanderson *et al.*, 2000), 19 (Sanderson *et al.*, 2001), 20 (Sanderson *et al.*, 2002), 21 (Monod *et al.*, 1993), 22 (Letcher *et al.*, 1999), 23 (Heneweer *et al.*, 2005), 24 (Saitoh *et al.*, 2001).

D'autres molécules comme les HAP sont également capables de perturber la stéroïdogénèse chez le poisson. Ainsi Monteiro *et al.* (2000b) mesurent une inhibition des activités aromatasés dans les ovaires de flets exposés *in vitro* à une série de HAP. Ces inhibitions se traduisent par une diminution de la quantité d'œstradiol sécrétée *in vitro*. Il est intéressant de noter que ces mêmes auteurs mettent en évidence un effet sur les concentrations en œstradiol circulant de ces mêmes molécules chez le flet exposé *in vivo* (Monteiro *et al.*, 2000b). Toutefois, pour certaines molécules, les effets observés entre les tests *in vitro* et les tests *in*

*vivo* ne sont pas les mêmes. Des études *in vitro* menées sur les microsomes d'ovaires de truite (Pelissero *et al.*, 1996) ou sur cellules H295R (Sanderson *et al.*, 2004) ont montré que des substances naturelles comme certains flavonoïdes (phyto-œstrogènes) sont capables d'inhiber les activités aromatasés. Cependant, les effets des phyto-œstrogènes *in vivo* sont beaucoup plus controversés car chez les rats exposés à des flavonoïdes par la nourriture, aucun effet sur l'aromatase n'a été détecté (Saarinen *et al.*, 2001; Weber *et al.*, 2001).

#### IV.6.1.2. Etudes *in vivo*

Diverses études ont été réalisées en laboratoire afin de déterminer les effets de certains perturbateurs endocriniens sur l'expression des aromatasés chez le poisson. Le tableau VI synthétise des données sur ces perturbations *in vivo* d'aromatase chez diverses espèces de poissons.

Pour certaines molécules, les effets observés *in vivo* ne sont pas ceux attendus. Le fadrozole, qui inhibe les activités aromatasés dans les essais sur microsomes et sur cellules (Tableau V), est également capable d'induire l'expression du gène *cyp19a* et les activités aromatasés dans les ovaires chez le vairon à tête de boule exposé *in vivo* (Villeneuve *et al.*, 2006).

De plus, les effets ne sont pas toujours les mêmes selon l'espèce étudiée. L'œstradiol induit l'expression du gène *cyp19b* dans le cerveau chez certaines espèces de poissons tels que le poisson zèbre et le poisson rouge (Gélinas *et al.*, 1998; Menuet *et al.*, 2005). Chez les vairons à tête de boule mâles, l'œstradiol inhibe l'expression du gène *cyp19b* dans le cerveau (Halm *et al.*, 2002).

Enfin, le sexe semble également avoir une influence sur les effets observés. Chez le vairon à tête de boule, l'œstradiol induit l'expression du gène *cyp19b* dans le cerveau des mâles mais pas des femelles (Halm *et al.*, 2002).

Ces études montrent l'importance des études *in vivo* pour compléter les données obtenues *in vitro*. Il est également important de prendre en compte les facteurs influençant ces effets tels que l'espèce ou encore le sexe des individus.

Tableau VI : Effets de molécules perturbatrices endocriniennes sur l'expression des aromatasés chez différentes espèces de poissons exposés *in vivo*. 11-beta-OHA : 11-beta-hydroxyandrosténédione ; AA : activité aromatasé ; ATD : androstatriénédione ; cyp19 : expression du gène cyp19 ; o,p'-DDT : o,p'-dichlorodiphényltrichloroéthane ; P450aroB : protéine aromatasé B ; ⬇ : inhibition ; ⬆ : induction.

Classe de molécule	Substance	Espèce	Concentrations	Temps d'exposition (jours)	Mesure	Effet	Référence
<b>Inhibiteurs d'aromatasé</b>	ATD	Poissons rouges		21	Cyp19 cerveaux	⬇	(Gelinas <i>et al.</i> , 1998)
	Fadrozole	Medaka	141,3 µg/L	14	AA cerveaux	⬇	(Kuhl and Brouwer, 2006)
		Vairons femelles	16 et 50 µg/L	7	AA cerveaux	⬇	(Villeneuve <i>et al.</i> , 2006)
		Vairons femelles	16 et 50 µg/L	7	AA ovaires	⬆	(Villeneuve <i>et al.</i> , 2006)
		Vairons femelles	5.5, 16 et 50 µg/L	7	Cyp19b cerveaux	⬇	(Villeneuve <i>et al.</i> , 2006)
		Vairons femelles	1.85, 5.5, 16 et 50 µg/L	7	Cyp19b ovaires	⬇	(Villeneuve <i>et al.</i> , 2006)
		Vairons femelles	1.85, 5.5, 16 et 50 µg/L	7	Cyp19a ovaires	⬆	(Villeneuve <i>et al.</i> , 2006)
		Vairons	50 µg/L	21	AA cerveaux	⬇	(Ankley <i>et al.</i> , 2002)
<b>Stéroïdes</b>	11-beta-OHA	Truite de 55jpf	1 mg/kg		Cyp19 gonades	⬇	(Govoroun <i>et al.</i> , 2001)
	Ethinyloestradiol	Poissons zèbres 20 jpf	0.001 à 100 µM	3	Cyp19b	⬆	(Kazeto <i>et al.</i> , 2004)
		Poissons zèbres 20 jpf	100 nM	3	Cyp19a	⬇	(Kazeto <i>et al.</i> , 2004)
		Poissons zèbres femelles	25 ng/L	7	AA cerveaux	⬆	(Andersen <i>et al.</i> , 2003)
		Saumon atlantique juvénile	50 ng/L	3	Cyp19b cerveaux	⬆	(Lyssimachou <i>et al.</i> , 2006)
		Saumon atlantique juvénile	5 et 50 ng/L	3	Cyp19a cerveaux	⬆	(Lyssimachou <i>et al.</i> , 2006)
		Saumon atlantique juvénile	50 ng/L	3	AA cerveaux	⬆	(Lyssimachou <i>et al.</i> , 2006)
		Oestradiol	Poissons rouges		21	Cyp19 cerveaux	⬆
		Poissons zèbres 48 hpf	0.01 et 1 µM	2	Cyp19b	⬆	(Menuet <i>et al.</i> , 2005)
		Poissons zèbres 48 hpf	0.01 et 1 µM	2	P450aroB	⬆	(Menuet <i>et al.</i> , 2005)
		Vairons mâles	320 ng/L	14	Cyp19 testicules	⬆	(Halm <i>et al.</i> , 2002)
		Vairons mâles	100 et 320 ng/L	4	Cyp19 cerveaux	⬇	(Halm <i>et al.</i> , 2002)
		Vairons femelles	100 et 320 ng/L	14	Cyp19 ovaires	⬆	(Halm <i>et al.</i> , 2002)
	Vairons femelles	32 et 100 ng/L	14	Cyp19 cerveaux	⬆	(Halm <i>et al.</i> , 2002)	

Classe de molécule	Substance	Espèce	Concentrations	Temps d'exposition (jours)	Mesure	Effet	Référence
<b>Stéroïdes</b>	Testostérone	Poissons rouges		21	Cyp19 cerveaux	↗	(Gelinas <i>et al.</i> , 1998)
<b>I. / organochlorés</b>	O,p' DDT	Medaka	7,5 µg/L	14	AA cerveaux	↗	(Kuhl and Brouwer, 2006)
<b>F. / imidazole</b>	Prochloraz	Vairons mâles	0.3 mg/L	21	AA cerv	↘	(Ankley <i>et al.</i> , 2005)
<b>F. / triazole</b>	Letrozole	Poissons zèbres 20 jpf	10 µM	3	Cyp19b	↘	(Kazeto <i>et al.</i> , 2004)
<b>Alkylphénols</b>	Nonylphénol	Poissons zèbres 20 jpf	0.01 à 1 µM	3	Cyp19b	↗	(Kazeto <i>et al.</i> , 2004)
		Rivulus	300 µg/L	4	Cyp19b cerveaux	↗	(Lee <i>et al.</i> , 2006)
		Rivulus	300 µg/L	4	Cyp19a ovaires	↘	(Lee <i>et al.</i> , 2006)
		Saumon atlantique juvénile	5, 15 et 50 µg/L	7	Cyp19b cerveaux	↗	(Meucci and Arukwe, 2005)
		Saumon atlantique juvénile	15 µg/L	7	Cyp19a cerveaux	↗	(Meucci and Arukwe, 2005)
		Rivulus	300 µg/L	4	Cyp19b cerveaux	↗	(Lee <i>et al.</i> , 2006)
<b>HAP</b>	Benzo[a]pyrene	Poissons zèbres 20 jpf	10 µM	3	Cyp19b	↗	(Kazeto <i>et al.</i> , 2004)
<b>Autres</b>	Bisphénol A	Rivulus	600 µg/L	4	Cyp19a ovaires	↗	(Lee <i>et al.</i> , 2006)
		Rivulus	600 µg/L	4	Cyp19b cerveaux	↗	(Lee <i>et al.</i> , 2006)
	Flutamide	Poissons zèbres femelles	100 µg/L	7	AA cerveaux	↗	(Andersen <i>et al.</i> , 2003)
	Tributyl étain	Medaka	0,631 µg/L	5	Cyp19 cerveaux	↘	(Kuhl and Brouwer, 2006)
		Medaka	0,631 µg/L	14	AA cerveaux	↘	(Kuhl and Brouwer, 2006)
		Saumon atlantique juvénile	250 ng/L	7	Cyp19b cerveaux	↘	(Lyssimachou <i>et al.</i> , 2006)
		Saumon atlantique juvénile	250 ng/L	7	Cyp19a cerveaux	↘	(Lyssimachou <i>et al.</i> , 2006)

#### IV.6.2 Etudes *in situ*

A l'heure actuelle, seules quelques études ont évalué la perturbation des activités aromatasés chez des poissons prélevés *in situ*. La première étude ayant permis de mettre en évidence des perturbations des activités aromatasés chez le poisson a été réalisée par Noaksson *et al.* en 2001, sur des gardons et des perches issus d'un lac suédois contaminé par une décharge publique. Dans cette étude, les poissons présentaient des signes évidents d'une perturbation endocrinienne qui se manifestait chez les femelles et les mâles par une diminution du GSI, et une altération des concentrations en stéroïdes circulants (diminution des concentrations en testostérone et en œstradiol). Chez les femelles, un faible pourcentage étaient sexuellement matures et les activités aromatasés cérébrales étaient significativement plus faibles (Noaksson *et al.*, 2001). En 2003, le même type de perturbation endocrinienne a été retrouvée chez des ombles de fontaine issus du même lac (Noaksson *et al.*, 2003).

Par la suite, différentes études de terrain ont été réalisées dans diverses rivières de différents pays. Dans la rivière Ebro, en Espagne, située en zone agricole, des inhibitions des activités aromatasés ont été notées dans les gonades des femelles de carpes (Lavado *et al.*, 2004). De la même façon, les activités aromatasés étaient inhibées dans les gonades des femelles de mullet rouge de la mer Méditerranée vivants au niveau des rejets d'eaux usées urbaines et industrielles (Martin-Skilton *et al.*, 2006), ainsi que dans les cerveaux des mâles et des femelles de brème de la rivière Elbe en Allemagne (Hecker *et al.*, In press b). Au vu de ces études, il semble que l'effet le plus couramment observé soit une inhibition des activités aromatasés. Une seule étude a pu mettre en évidence une induction des activités aromatasés chez des poissons exposés *in situ*. Aux Etats-Unis, l'exposition de gambusies à des effluents d'une usine à papier se traduit par une augmentation des activités aromatasés cérébrales et ovariennes chez les femelles adultes (Orlando *et al.*, 2002).

L'ensemble de ces études montre clairement que des substances perturbant les activités aromatasés cérébrales et ovariennes sont présentes dans l'environnement aquatique, montrant ainsi la pertinence de la mesure de ces activités chez des poissons prélevés *in situ* dans les rivières dans le but d'évaluer l'exposition des poissons à des perturbateurs endocriniens. Il est toutefois important de noter que la majorité de ces études est réalisée chez des poisson femelles, que toutes les mesures sont faites au niveau des activités enzymatiques, et surtout que la nature des substances mises en cause n'a pas été déterminée.

## V. OBJECTIFS

L'objectif de cette thèse s'inscrit dans une stratégie de développement de nouveaux marqueurs biologiques qui puissent rendre compte d'une perturbation de la fonction de reproduction chez le poisson. Plus spécifiquement, elle vise à étudier les effets des perturbateurs endocriniens sur les enzymes à cytochrome P450 aromatasase cérébrales et gonadiques chez le poisson, et à déterminer si les expressions des P450 aromatasases peuvent constituer des marqueurs biologiques potentiels d'une perturbation endocrinienne chez le poisson.

Dans le cadre de ce travail, différents aspects complémentaires ont été étudiés :

1. La mise en place des méthodes permettant d'étudier l'expression des aromatasases chez le poisson,
2. La caractérisation des expressions chez les poissons témoins à différents stades de développement afin de mieux appréhender les fluctuations naturelles de l'expression,
3. L'étude des effets de perturbateurs endocriniens sur ces expressions.

## VI. ORGANISATION DU MANUSCRIT

La suite du manuscrit se découpe de la manière suivante :

Le Matériels et Méthodes décrit les choix méthodologiques ainsi que les principes des techniques utilisées dans cette étude.

La partie Résultats est organisée comme suit :

- La première partie rassemble la mise en place et l'optimisation des différentes méthodes de dosages.
- Une deuxième partie détaille la caractérisation des expressions / activités aromatasases chez notre modèle d'étude, le poisson zèbre, à différents stades de développement.
- La troisième partie de ce travail rassemble les données obtenues sur les perturbations des expressions / activités aromatasases par des perturbateurs endocriniens. Ces perturbateurs endocriniens sont découpés en deux catégories selon leur potentiel inducteur ou inhibiteur des expressions / activités aromatasases.

Un premier article (article 1) étudie la perturbation des expressions / activités aromatasase cérébrales et gonadiques chez les poissons zèbres femelles exposés *in vivo* à un inducteur modèle, l'œstradiol ou à un inhibiteur modèle, l'androstatriènedione. Cet article confirme la

capacité de deux molécules à activité perturbatrice endocrinienne à interagir avec l'aromatase *in vivo*.

Nous nous sommes ensuite intéressés plus particulièrement à l'effet des inhibiteurs d'aromatase. Au vu du manque de données sur les inhibiteurs d'aromatase chez le poisson, nous avons dans un premier temps réalisé un criblage de molécules afin d'en ressortir des molécules inhibitrices des activités aromatasés *in vitro*. L'article 2 présente la mise en place de ce test de criblage sur microsomes de truite ainsi que les résultats obtenus avec les 43 substances testées. De ce test nous avons dégagé une molécule, le clotrimazole, qui s'est avéré être la molécule la plus inhibitrice des activités aromatasés, après les inhibiteurs stéroïdiens. L'article 3 présente les expérimentations *in vivo* réalisées sur poisson zèbre avec le clotrimazole, ainsi que les expérimentations *in vitro* réalisées afin de déterminer le mode d'action de cette molécule.

Enfin, nous avons regardé l'effet de molécules inductrices sur les aromatasés. L'article 4 s'intéresse aux effets de deux molécules environnementales, connues pour leurs effets œstrogéniques, le nonylphénol et l'éthinyl-œstradiol, sur l'expression des aromatasés cérébrales et gonadiques chez le poisson zèbre, afin de déterminer si les effets observés avec des molécules œstrogéno-mimétiques sont les mêmes qu'avec l'œstradiol.

Ces travaux sur les inducteurs d'aromatase nous ont permis de mettre en place un protocole pour tester le potentiel oestrogéno-mimétique des molécules sur larves de poissons zèbres.

Les publications relatives à ce travail de thèse sont rassemblées en annexe.

Enfin une Discussion générale ainsi que des Conclusions et Perspectives à ce travail de thèse viennent clôturer ce manuscrit.



## MATERIELS ET METHODES

Cette partie présente les choix méthodologiques effectués au cours de la réalisation de ce projet, ainsi que le principe des méthodes de dosages utilisées. Pour le détail des protocoles de mesure, le lecteur est invité à se référer aux différents articles en annexe.

### I. CHOIX METHODOLOGIQUES

#### I.1. Choix des modèles biologiques

Les deux modèles biologiques retenus pour cette étude sont un salmonidé, la truite (*Oncorhynchus mykiss*), et un cyprinidé, le poisson zèbre (*Danio rerio*).

##### I.1.1 Truite Arc-en-ciel

La truite Arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), appartient à la classe des téléostéens, à l'ordre des salmoniformes et à la famille des salmonidés. C'est une espèce très largement étudiée compte tenu de son importance économique (salmoniculture) et, de fait, il est aisé de se fournir en lots homogènes auprès des piscicultures. A l'initiation de ce projet, la truite arc-ciel a été sélectionnée en raison des données bibliographiques importantes sur la biologie de la reproduction de cette espèce et sur l'implication forte de l'expression des aromatasés pour la reproduction (différenciation sexuelle, vitellogenèse). Par ailleurs, la truite est un modèle pour lequel des méthodes de mesure de l'expression des gènes de l'aromatase ainsi que des activités aromatasés ont déjà été développées (Shilling *et al.*, 1999; Dalla Valle *et al.*, 2002; Menuet *et al.*, 2003). De plus, les effets de divers polluants sur la stéroïdogénèse gonadique et plus particulièrement sur les activités d'aromatase avaient été démontrés (Monod *et al.*, 1993; Pelissero *et al.*, 1996). A ces avantages s'opposent des contraintes expérimentales inhérentes à ce modèle biologique. S'il est relativement aisé de maintenir au laboratoire des truites juvéniles ou adultes pendant plusieurs semaines, la conduite d'expérimentations plus complexes visant à étudier par exemple l'expression et les perturbations des aromatasés à des stades de développement bien spécifiques exige des installations plus lourdes et coûteuses.

Par ailleurs, les études de reprotoxicité sur cette espèce sont difficilement réalisables en raison des temps d'expérimentations très longs.

Par conséquent, notre choix s'est porté vers le modèle poisson zèbre (*Danio rerio*) qui ne présente pas ces inconvénients et pour lequel le laboratoire dispose d'installations expérimentales permettant de maîtriser sa reproduction et son élevage.

### 1.1.2 Poisson zèbre

Le poisson zèbre (*Danio rerio*) appartient à la classe des téléostéens, à l'ordre des cypriniformes et à la famille des cyprinidés. C'est un poisson tropical qui vit dans les petits cours d'eau douce de certaines régions d'Inde et de Birmanie. En tant qu'espèce tropicale, il ne peut être considéré comme représentatif des milieux aquatiques septentrionaux. Cependant, les caractéristiques de cette espèce en font un excellent modèle de laboratoire pour les études de toxicité de la reproduction :

- c'est une espèce à cycle de vie court, dont l'élevage est aisé au laboratoire : il atteint sa maturité sexuelle rapidement (entre 75 et 100 jours (Laale, 1977)),
- les pontes sont régulières (tous les 3 à 5 jours),
- les œufs ne sont pas adhérents, ce qui facilite leur manipulation, et transparents, ce qui permet d'observer les stades de développement,
- à l'âge adulte, il atteint 4 à 5 cm de long (Laale, 1977). A ce stade, il est relativement aisé de distinguer les mâles des femelles sur la base de critères morphologiques externes : les femelles ont un abdomen plus bombé que les mâles et elles présentent une papille uro-génitale bien visible à l'âge adulte (Brion *et al.*, 2004).

Par ailleurs, il s'agit d'une espèce recommandée pour les tests réglementaires d'écotoxicité aquatique.

Il est important de signaler que les informations relatives à l'expression des aromatasés chez ce poisson se limitaient à celles des gènes *cyp19a* et *cyp19b* (Kazeto *et al.*, 2001; Kishida and Callard, 2001; Kishida *et al.*, 2001; Kazeto *et al.*, 2003).

## I.2. Démarche et choix des méthodes de dosages

Dans le cadre de notre travail, nous avons choisi d'étudier les aromatasases en parallèle au niveau de l'expression génique, protéique et des activités enzymatiques. Pour ce faire, nous avons décidé d'utiliser la technique de l'ADN branché pour mesurer les expressions géniques car cette technique nécessitait une mise au point moins importante que les techniques de RT-PCR. Pour étudier la synthèse protéique, nous avons eu recours à la synthèse d'anticorps anti-P450aromatase A et B de poisson zèbre puisqu'il n'en existait aucun de disponible à l'initiation de ce projet. Enfin, pour la mesure des activités aromatasases, nous avons choisi d'utiliser une méthode de mesure directe, la méthode de l'eau tritiée, car nous disposions du matériel nécessaire au laboratoire (cf IV.3. de la SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE)

## I.3. Choix des molécules

Les molécules retenues dans le cadre de ce travail se répartissent en deux groupes : les molécules modèles et les polluants environnementaux.

### I.3.1 Choix des molécules modèles

Parmi les molécules modèles nous avons retenu un œstrogène naturel, le  $17\beta$ -œstradiol (E2) et deux inhibiteurs stéroïdiens des P450 aromatasases, l'androstatriènedione (ATD) et la 4-hydroxyandrosténédione (4OHA).

L'E2 est une hormone stéroïdienne endogène produit de la réaction d'aromatisation dont le rôle dans la régulation de l'expression du gène *cyp19b* est bien documenté (Callard *et al.*, 2001). En outre, les effets de l'E2 ont été particulièrement étudiés dans le contexte d'études sur la perturbation endocrinienne en raison de sa capacité à induire l'expression de gènes œstrogéno-dépendants et à induire une féminisation phénotypique du sexe chez les mâles. De plus, sa présence dans les effluents et les eaux de surface est très documentée et des effets à faibles concentrations sur la reproduction des poissons ont pu être mis en évidence.

Les autres molécules modèles sont des inhibiteurs stéroïdiens des P450 aromatasases : l'ATD et la 4OHA. Leur capacité à inhiber les activités d'aromatisation a été démontrée aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, dans divers modèles de vertébrés dont les poissons.

### *I.3.2 Polluants environnementaux*

Dans le contexte de notre étude, il était indispensable de ne pas se limiter à des substances modèles mais de s'interroger sur les effets de substances qui contaminent l'environnement sur l'expression des aromatasases. Ces molécules ont été choisies en raison de leurs fortes occurrences environnementales et/ou pour leurs effets perturbateurs endocriniens connus ou suspectés.

Nous avons choisi des molécules connues pour leur capacité à mimer l'action de l'œstradiol. Différents xéno-œstrogènes présentant des affinités variables pour les récepteurs des œstrogènes ont été sélectionnés : l'éthinyl-œstradiol (un œstrogène de synthèse de forte affinité, EE2), des alkylphénols polyéthoxylés de faibles affinités pour les ERs (nonylphénol (NP), le 4-tert-pentylphénol (4-t-PP), et le 4-tert-octylphénol (4-t-OP), ainsi que le bisphénol A (BPA).

Par ailleurs, le manque de données concernant les molécules capables de perturber les activités d'aromatase nous a conduit à réaliser un criblage de molécules afin de déterminer leurs effets sur les P450 aromatasases de poisson. Cette phase de criblage a été réalisée *in vitro* à l'aide d'un modèle acellulaire développé dans le cadre de ce travail. A l'issue de ce criblage, la molécule la plus active a été testée *in vivo* afin de déterminer les effets de cette molécule sur l'expression des aromatasases cérébrale et gonadique chez le poisson.

## **II. METHODES DE DOSAGE DES EXPRESSIONS / ACTIVITES AROMATASES**

### **II.1. Dosages d'ARNm des gènes *cyp19a* et *cyp19b***

#### *II.1.1 Principe du dosage*

Les dosages d'ARNm sont réalisés par la méthode de l'ADN branché (Kit Quantigène®, Panomics, USA). Cette méthode permet une mesure directe des ARNm du gène cible à partir de tissus homogénéisés. La méthode est basée sur une hybridation coopérative de sondes ARN puis d'un ADN branché sur l'ARNm cible (Figure 5).

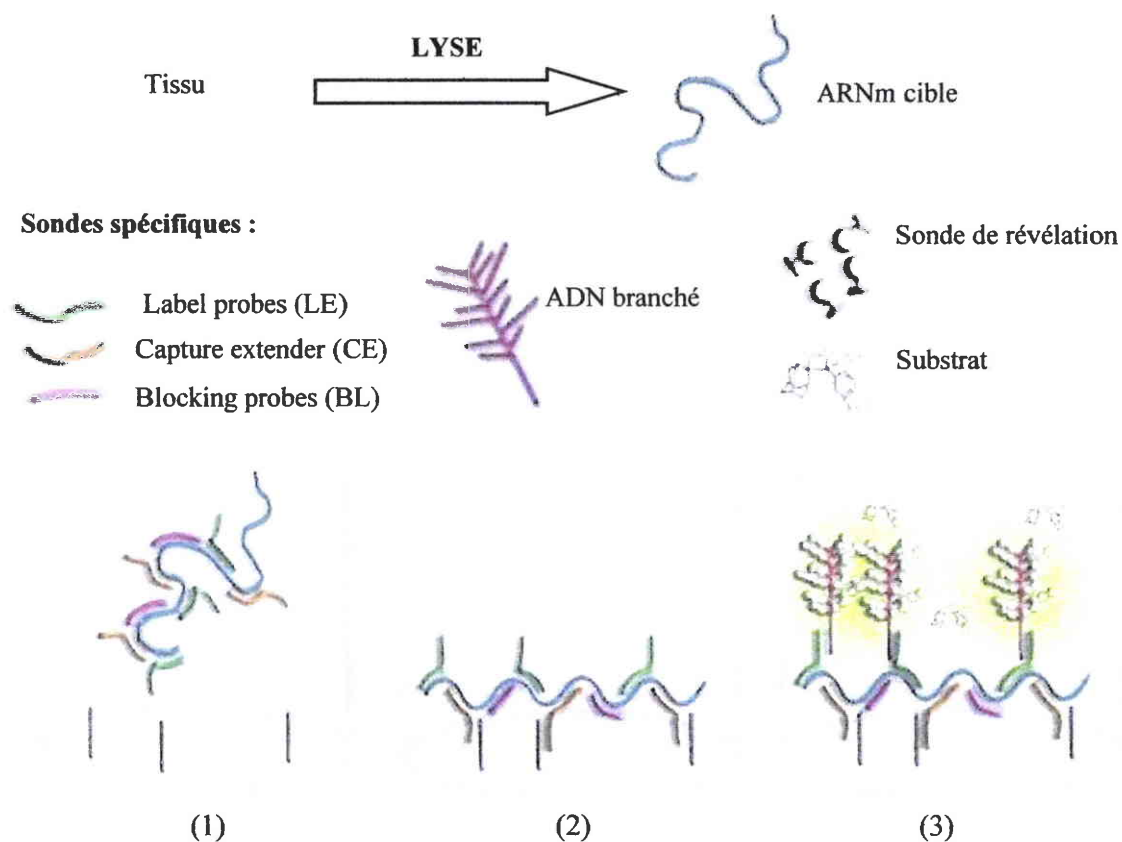


Figure 5 : Principe de la méthode de dosage de l'ARNm utilisant l'ADN branché (kit Quantigene®). L'ARN cible issu de l'échantillon lysé s'hybride spécifiquement aux sondes (1), les sondes de capture permettent de retenir l'ARN dans la plaque (2). L'ADN branché vient se fixer sur les extensions de marquage puis les sondes de révélation se fixent sur l'ADNb. L'ajout du substrat luminescent (3) renvoie un signal proportionnel à la quantité d'ARNm présent dans l'échantillon.

L'ARNm d'intérêt, libéré par le broyage des tissus et la lyse des cellules, est capturé par un ensemble de sondes oligonucléotidiques de synthèse possédant des séquences complémentaires de l'ARNm cible :

- Les « capture extender » (CE), qui s'hybrident pour moitié à l'ARNm cible et pour une autre moitié à des oligonucléotides de capture placés dans le fond de la plaque,
- Les « blocking probes » (BL), qui sont entièrement complémentaires de l'ARNm cible, et ont un rôle de linéarisation,
- Les « label probes » (LE), qui s'hybrident également pour moitié avec l'ARNm cible et pour une autre moitié avec une séquence de l'ADN branché (ADNb). L'ADNb possède 15 branches, comportant chacune 3 copies d'une séquence complémentaire de la sonde de révélation, et peut donc se lier à 45 sondes de révélation. De la phosphatase alcaline est fixée

par liaison covalente à chaque sonde de révélation, permettant ainsi la dégradation du substrat, le dioxetan, en produit luminescent. La luminescence émise est proportionnelle à la quantité d'ARNm cible présente, et est mesurée par un luminomètre.

Pour chacun des gènes cibles (*cyp19a* et *cyp19b*) ainsi que pour le gène de ménage, la  $\beta$ -actine, les séquences des sondes oligonucléotidiques sont spécifiques des ARNm et ont été synthétisées à partir des séquences d'ADNc disponibles sur la banque de données Genbank (numéros d'accès AF183906, AF183908, et NM 131031 pour les gènes *cyp19a*, *cyp19b* et  $\beta$ -actine de poisson zèbre respectivement).

### II.1.2 Expression des résultats

La valeur de luminescence de chaque échantillon est obtenue en soustrayant la moyenne de luminescence des blancs à la moyenne de luminescence des duplicats de l'échantillon. Le résultat obtenu est normalisé par le niveau d'expression de la beta-actine contenue dans le même échantillon. Les résultats sont ensuite présentés sous forme de moyenne des échantillons testés  $\pm$  écart type, et sont sans unité.

## II.2. Détection des protéines P450 aromatasés de poisson zèbre

A l'initiation de ce projet, aucun anticorps n'était disponible pour mesurer l'expression protéique des aromatasés A et B de poisson zèbre. Le seul anticorps anti-P450 aromatasé de poisson développé l'avait été à partir d'une séquence polypeptidique consensus de l'aromatase B de poisson (Forlano *et al.*, 2001). Cet anticorps est capable de croiser avec l'aromatase B de poisson crapaud à nageoires unies (Forlano *et al.*, 2001), de truite arc-en-ciel (Menuet *et al.*, 2003) mais ne reconnaît pas l'aromatase B de poisson zèbre (Menuet *et al.*, 2003). Il nous a donc été nécessaire de synthétiser de nouveaux anticorps anti-P450aroA et B de poisson zèbre. Parmi les différentes stratégies qui s'offraient à nous (e.g., purification des aromatasés cérébrales et gonadiques à partir des cerveaux et des ovaires, purification de protéines recombinantes sur-exprimées dans des modèles cellulaires), nous avons choisi d'immuniser des lapins à partir de séquences polypeptidiques spécifiques de chacune des deux isoformes de l'aromatase de poisson zèbre.

### *II.2.1 Synthèse des anticorps anti-P450aroA et B de poisson zèbre*

Les antisérums ont été produits chez des lapins femelles de souche New Zealand White. Le sérum anti-P450aroB est dirigé contre le peptide de synthèse NH<sub>2</sub>-CNSNGETADNRTSKE-COOH qui correspond aux 15 derniers résidus de la séquence de l'aromatase B de poisson zèbre (acides aminés 497-511). Le sérum anti-P450aroA est dirigé contre le peptide de synthèse NH<sub>2</sub>-CMDSVLAGQSLQHSH-CONH<sub>2</sub> correspondant aux acides aminés 355 à 368 de la séquence de l'aromatase A de poisson zèbre. Chaque polypeptide a été couplé à une protéine « transporteuse ». Pour chaque polypeptide, deux lapins ont été immunisés selon le protocole suivant. Les lapins ont subi trois injections intradermiques (J0, J21 et J41) : la première dans de l'adjuvant complet de Freund, et les deux suivantes dans de l'adjuvant incomplet de Freund. Ils ont ensuite subi une injection sous cutanée (J63) dans de l'adjuvant Incomplet de Freund. A J84 (aromatase B) et J88 (aromatase A), les animaux ont été saignés et les sérums ont été congelés à -80°C. Pour chaque sérum, une fraction a été immunopurifiée par chromatographie d'affinité.

### *II.2.2 Caractérisation des anticorps anti-P450aroA et anti-P450aroB*

Afin de caractériser les anti-sérums A et B et les fractions immunopurifiées correspondantes différentes techniques ont été mises en œuvre : western-blot, ELISA et immunohistochimie. Ici nous rappelons le principe des méthodes utilisées, les détails concernant les protocoles étant exposés dans les articles 3 et 4.

#### *II.2.2.1. Western-blot*

Le western-Blot est utilisé pour déterminer la spécificité des anticorps (AC) anti-P450aroA et B synthétisés, et également pour caractériser les AC et l'expression des aromatasés.

Les protéines de l'échantillon sont séparées selon leur taille sur un gel lors de l'électrophorèse. Les protéines dans le gel sont alors transférées sur une membrane de nitrocellulose par application d'un courant électrique. Les sites d'interactions non spécifiques de la membrane sont ensuite saturés à l'aide d'une solution d'albumine de sérum bovin (BSA), puis la membrane incubée avec l'AC anti-P450aroA ou B de poisson zèbre. Une seconde incubation

est réalisée avec l'AC secondaire, qui reconnaît les anticorps de lapin dans notre cas, et qui est couplé à une peroxydase.

L'immunoréactivité des bandes est révélée en ajoutant à la membrane du luminol et de l'eau oxygénée, substrat de la peroxydase. L'oxygène, issu du clivage de l' $H_2O_2$  par la peroxydase, va oxyder le luminol, lequel est excité et émet de la lumière à 428 nm. Un film autoradiographique, sensible à la lumière, permet ensuite de révéler les protéines présentes sur la membrane.

La figure 6 schématise le système de révélation de la protéine par le western-blot.

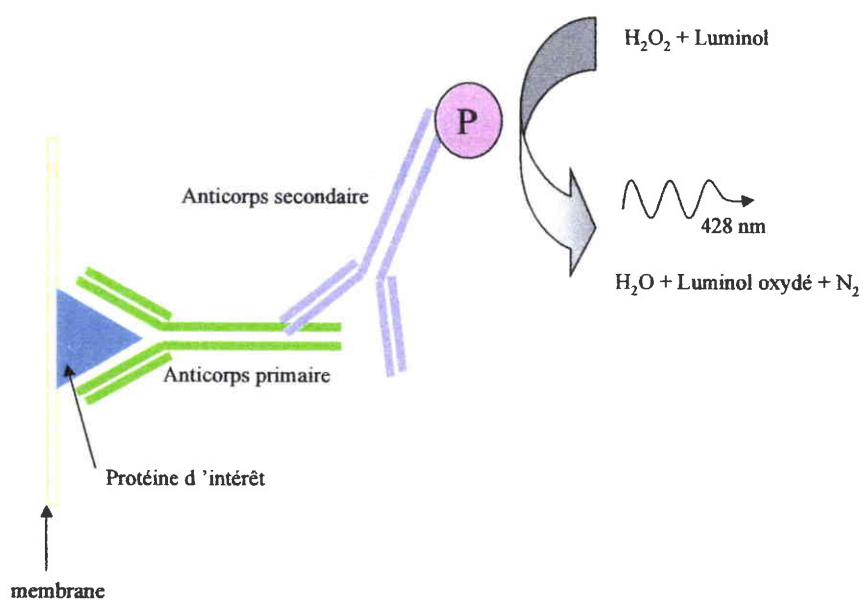


Figure 6 : Représentation schématique du système de révélation de la protéine par western-blot. P : peroxydase

#### II.2.2.2. ELISA

De même que pour le western-blot, l'ELISA est utilisé pour détecter la protéine P450aroA ou B dans un échantillon à l'aide de l'AC spécifique.

Les échantillons sont coatés dans le fond des puits d'une plaque 96 puits. Les puits sont saturés avec de la BSA. La protéine d'intérêt fixe l'AC anti-P450aroA ou B, qui ensuite fixe l'AC secondaire couplé à la peroxydase.

L'immunoréactivité des puits est révélée non pas par une réaction luminescente mais par une réaction colorée. L'ajout de tétraméthyl benzydine et d'eau oxygénée, substrat de la



péroxydase, entraîne une réaction qui forme un produit bleuté. La réaction colorimétrique est stoppée par l'ajout d'acide phosphorique, et la couleur bleue tourne au jaune. L'absorbance est lue au luminomètre à 450 nm.

### II.2.2.3. Localisation cellulaire de la protéine par immunohistochimie

L'immunohistochimie est également une technique qui permet de marquer les protéines aromatase B grâce aux AC spécifiques. Ces marquages sont réalisés sur des coupes histologiques de tissus prélevés sur les organismes.

La première étape consiste à bloquer les peroxydases endogènes à l'aide d'une solution d'eau oxygénée. Les coupes sont ensuite saturées avec de la poudre de lait, incubées avec l'AC primaire anti-P450aroA ou B, puis avec l'AC secondaire couplé à de la biotine, et enfin avec de la streptavidine-péroxydase. Cette étape supplémentaire permet d'amplifier le signal coloré.

L'immunoréactivité des coupes est révélée par une réaction colorée. L'ajout de diaminobenzidine, substrat de la peroxydase, entraîne une réaction colorée qui est amplifiée par le nickel comme décrit dans les travaux de Shu *et al.*, 1988. Les marquages ainsi obtenus sont d'une couleur violette foncée à noir.

## II.3. Mesure des activités enzymatiques P450 aromatasés chez la truite et le poisson zèbre

### II.3.1 Principe de la méthode de l'eau tritiée

La méthode utilisée est la méthode dite de l'eau tritiée (Thompson and Siiteri, 1974). Elle est basée sur la réaction d'aromatation des androgènes en œstrogènes par l'aromatase. Le substrat utilisé pour la réaction d'aromatation est un substrat radiomarqué (la 1-beta-[<sup>3</sup>H]androsténédione). En présence de l'aromatase, la 1-beta-[<sup>3</sup>H]androsténédione est transformée en œstrone. Pour une molécule d'œstrone formée, il y a trois molécules de NADPH et trois molécules d'oxygène consommées (Figure 7).

Après la fixation du substrat, l'oxygène est inséré dans la molécule par trois hydroxylations séquentielles. La première hydroxylation se fait au niveau du carbone 19 (groupe méthyl) afin de générer un alcool à 19 carbones. La seconde hydroxylation a également lieu au niveau du carbone 19, aboutissant à la perte d'une molécule d'eau et à la formation d'un aldéhyde à 19 carbones. La dernière étape de cette réaction est mal connue à l'heure actuelle, mais il semble que la troisième hydroxylation se fasse également au niveau du carbone 19. En même temps que cette dernière hydroxylation se produit l'aromatisation de la boucle A en boucle phénolique, ce qui entraîne la perte stéréospécifique des hydrogènes 1-β et 2-β (Lephart, 1996).

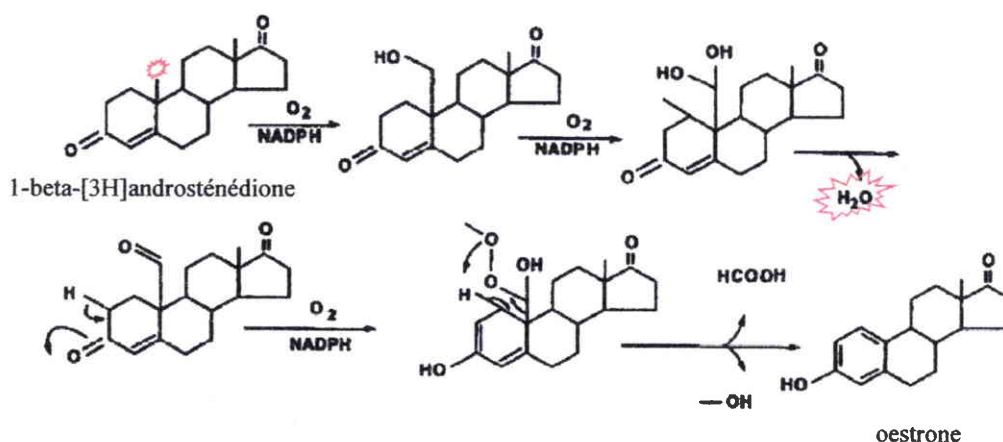


Figure 7 : Représentation de la réaction d'aromatisation de l'androsténédione radiomarquée en œstrone. (D'après Lephart, 1996)

L'hydrogène 1-β se retrouve en phase aqueuse une fois perdu par l'androsténédione. C'est donc la radioactivité engendrée par cet hydrogène 1-β dans la phase aqueuse qui est mesurée dans un compteur à scintillation, après élimination du substrat radiomarqué non consommé. Le nombre de molécules d'hydrogène radiomarquées perdues lors de la réaction d'aromatisation étant proportionnel au nombre de molécules d'androsténédione consommées et donc au nombre de molécules d'œstrone formées, la radioactivité mesurée est proportionnelle à l'activité d'aromatisation.

### *II.3.2 Expression des résultats*

Dans un premier temps les coups par minute mesurés pour les échantillons sont corrigés par la mesure des coups par minute des blancs (contrôles sans substrat radiomarqué et témoins BSA) et sont convertis en désintégration par minute en tenant compte de l'efficacité de comptage du lecteur de microplaques. La radioactivité des échantillons, exprimée en Curie, est ensuite calculée en tenant compte du facteur de dilution de la phase aqueuse. Connaissant l'activité spécifique du substrat il est aisé de convertir cette mesure de radioactivité exprimée en Curie en quantité de molécules d'androsténédione que l'on exprime en femtomoles. Les activités sont ensuite normalisées par la quantité de protéines totales mircrosomales et par le temps d'incubation pour arriver à un résultat en fmol/mg/min.



## **RESULTATS**

Dans cette partie, les résultats qui n'ont pas été valorisés sous forme d'article seront présentés en détail, et les résultats présentés dans les articles seront présentés de manière plus succincte.

### **I. DEVELOPPEMENTS DE METHODES DE MESURE DES P450 AROMATASES**

#### **I.1. Objectifs**

A l'initiation de cette thèse, aucune méthode n'était disponible au laboratoire pour mesurer l'expression des aromatasés chez le poisson. Le premier objectif du travail a donc consisté à développer et/ou à optimiser des méthodes permettant d'étudier l'expression des P450 aromatasés. Nous nous sommes fixés comme objectif de développer des méthodes permettant d'étudier l'expression des gènes, des protéines et des activités enzymatiques dans les cerveaux et les gonades de poissons. Ce choix d'étudier les aromatasés à différents niveaux d'expression (gènes, protéines, activités enzymatiques) vise à acquérir des informations originales sur les P450 aromatasés, les études disponibles dans la littérature se limitant à l'analyse des gènes ou des activités enzymatiques.

#### **I.2. Résultats et discussion**

Le tableau VII synthétise les différentes méthodes développées pour les deux espèces modèles, la truite arc-en-ciel et le poisson zèbre. Ces méthodes ont été utilisées dans différents contextes qui sont présentés plus loin. Dans les paragraphes qui suivent, les principaux résultats concernant le développement et la validation des méthodes sont présentés.

Tableau VII : Méthodes développées pour quantifier les expressions et activités aromatasés chez le poisson zèbre (*Danio rerio*) et la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*).

	Méthodes	Espèces	Adultes	Larves	Réactifs	Références
ARNm						
cyp19a et cyp19b	ADN branché	D. rerio	Cerveaux et gonades	Larves entières	Quantigène	Article 1, 3 et 4
Protéine AroB	Immunohistochimie	D. rerio	Cerveaux	Cerveaux	AC anti-P450aroB	Article 3 et 4
	ELISA	D. rerio	Cerveaux	Non testé	AC anti-P450aroB	Article 3
	Western-Blot	D. rerio	Cerveaux	Non testé	AC anti-P450aroB	Article 3
Activités aromatasés	Méthode de l'eau tritiée	D. rerio	Cerveaux et gonades	Non testé	1-beta- <sup>3</sup> H]androsténédione	Article 1 et 3
		O. mykiss	Cerveaux et gonades	Non testé	1-beta- <sup>3</sup> H]androsténédione	Article 2

On constatera que l'effort de développement méthodologique s'est porté sur le poisson zèbre alors que pour la truite arc-en-ciel, les développements n'ont concernés que la mesure d'activité d'aromatation.

### 1.2.1 Méthode de mesure de l'expression des gènes cyp19 chez le poisson zèbre

Les premiers travaux ont eu pour objectif d'acquérir une méthodologie permettant l'étude de l'expression des gènes cyp19 a et b chez le poisson zèbre à l'aide de la méthode de l'ADN branché. Cette méthode en microplaque, d'utilisation relativement récente et simple comparativement à la méthode classique de RT-PCR, permet de mesurer l'expression des gènes *via* un système de détection directe des ARNm d'intérêts. Ce système présente l'avantage de ne pas nécessiter de transcription inverse et d'amplification. Les premières expérimentations avaient pour but de déterminer la faisabilité de cette méthode pour l'étude de l'expression des gènes cyp19 chez le poisson zèbre à différents stades de son développement (adulte, larve) et de la valider en déterminant notamment les profils d'expression en fonction du tissu. Afin de se placer dans des conditions de mesures optimales, la linéarité entre la luminescence émise et la quantité de tissu a été déterminée pour chaque gène cible et pour le gène de ménage ( $\beta$ -actine). Les conditions expérimentales retenues ainsi

que les caractéristiques du dosage (limite de détection, limite de quantification) sont présentées dans le tableau VIII. Chez l'adulte, la méthode de l'ADN branché permet une mesure spécifique de l'expression des gènes *cyp19a* et *b* dans chaque tissu (cerveaux et gonades) d'un même individu. Cependant, contrairement à certaines méthodes de RT-PCR développées chez le poisson zèbre qui permettent une mesure individuelle de l'expression des gènes *cyp19* dans la tête ou le tronc des larves (Fenske and Segner, 2004; Kazeto *et al.*, 2004), la méthode de l'ADN branché ne permet qu'une mesure de l'expression des gènes cibles sur des homogénats de corps entiers d'un pool de 10 larves.

Tableau VIII : Conditions expérimentales et limites de détection et de quantification du dosage des ARNm par la méthode de l'ADN branché pour les gènes cibles, *cyp19a* et *cyp19b*, et le gène de ménage,  $\beta$ -actine, chez le poisson zèbre. RLU : unité de luminescence.

		<b>Cyp19a</b>	<b>Cyp19b</b>	<b><math>\beta</math>-actine</b>
<i>Quantité de tissu / puits</i>				
Adultes	Cerveaux	0.05 mg	0.05 mg	0.02 mg
	Gonades	0.05 mg	0.05 mg	0.02 mg
Larves	Corps entier	1 larve	1 larve	1 larve
<i>RLU / puits</i>				
Limites	Détection	2422	2701	2463
	Quantification	4237	5093	4562

### *1.2.2 Méthode de mesure de l'expression des protéines P450aromatase A et B chez le poisson zèbre*

#### *1.2.2.1 Spécificité des anticorps en Western-blot et ELISA*

La spécificité des anti-sérums A et B et des fractions immunopurifiées correspondantes a été analysée par western-blot en utilisant des fractions microsomales et cytosoliques de cerveaux, d'ovaires et de foies issues de femelles mûres. L'analyse des western-blot réalisés avec les sérums anti-P450aroA et anti-P450aroB ainsi qu'avec les AC immunopurifiés anti-P450aroA a révélé un manque de spécificité de ces anticorps vis-à-vis des aromatasés quelque soient les tissus et les fractions sub-cellulaires étudiés (résultats non montrés).

En revanche, les résultats obtenus avec les AC immunopurifiés anti-P450aroB montrent qu'ils marquent spécifiquement une protéine microsomale dans le cerveau ainsi qu'une protéine microsomale dans les ovaires (Figure 8). Au contraire, aucun marquage n'est obtenu ni dans les fractions cytosoliques de ces tissus ni dans les fractions microsomales et cytosoliques de foie. Dans le cerveau, la protéine a un poids moléculaire (PM) de 47 KDa alors que dans les ovaires la protéine a un PM apparent plus élevé de 58 KDa.

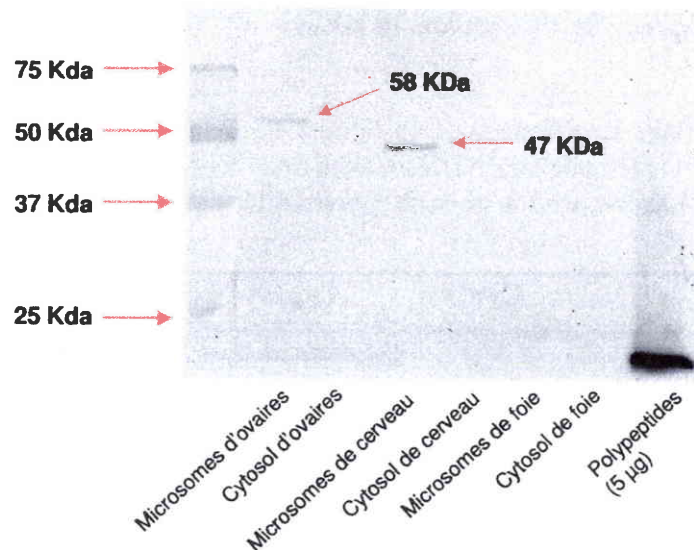


Figure 8 : Détection de la protéine aromatase par western-blot dans différentes fractions sub-cellulaires de différents tissus à l'aide d'un anticorps immunopurifié anti-P450aroB (dilution 1:100<sup>ème</sup>).

Ces résultats sont cohérents avec la localisation sub-cellulaire de l'aromatase, i.e. le réticulum endoplasmique. De plus, aucun marquage n'a été observé dans les fractions microsomales et cytosoliques de foie ce qui est en accord avec l'absence d'expression de l'aromatase dans le foie chez le poisson zèbre (Kishida and Callard, 2001). Enfin, les marquages sont plus intenses dans les cerveaux (forte expression de P450aro) et moindres dans les ovaires ce qui est en accord avec la répartition de l'expression des gènes *cyp19a* et *b* en fonction des tissus, i.e. expression plus importante dans le cerveau comparativement aux ovaires. L'ensemble de ces données tend à suggérer que les AC anti-P450aroB immunopurifiés croisent avec deux formes différentes de l'aromatase du poisson zèbre, l'aromatase B, majoritairement exprimée dans le cerveau et l'aromatase A majoritairement exprimée dans les ovaires. Nos résultats concernant l'aromatase cérébrale sont en accord avec ceux obtenus par Kah *et al.* (communication personnelle) qui ont trouvé un PM de 47Kda pour la P450aroB à l'aide d'un



AC développé à partir d'une protéine recombinante sur-exprimée dans E. Coli. Cependant, le croisement spécifique observé avec la protéine dans les ovaires est intrigant. Le PM apparent de cette protéine correspond au PM théorique de l'aromatase A (dédit à partir de la séquence d'acides aminés). Toutefois, l'AC anti-P450aroB a été synthétisé à partir d'une séquence spécifique de la protéine aromatase B, et n'est donc pas supposé croiser avec l'aromatase A. Des études plus poussées seraient donc nécessaires pour identifier formellement cette protéine.

Pour aller plus loin dans la caractérisation de cet anticorps anti-P450aroB, des expériences complémentaires ont été réalisées à l'aide d'une méthode ELISA indirecte ainsi qu'en immunohistochimie.

Les résultats obtenus par méthode ELISA indirecte confirment ceux obtenus en western-blot à savoir une localisation sub-cellulaire de l'aromatase dans la fraction microsomale, une expression plus importante dans les cerveaux que dans les ovaires et une absence d'expression dans le foie quelque soit la fraction sub-cellulaire étudiée (Figure 9).

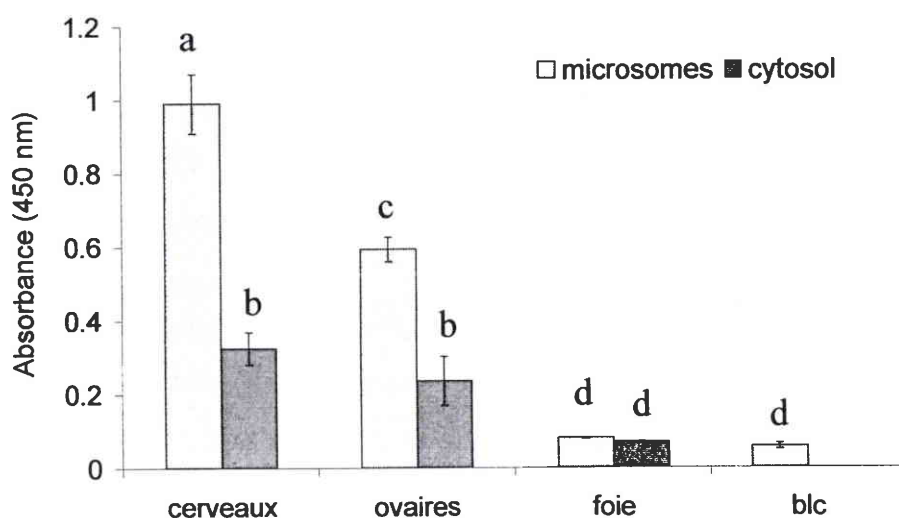


Figure 9 : Détection de la protéine aromatase dans différents tissus à l'aide d'une méthode ELISA indirecte développée à l'aide d'un anticorps immunopurifié anti-P450aromatase B (dilution 1:100<sup>ème</sup>). Des lettres différentes indiquent une différence entre les moyennes statistiquement significative (Test t de Student,  $p < 0.05$ ).

### I.2.2.2. Spécificité des anticorps en immunohistochimie

Les sérums anti-P450aroA et B et les fractions immunopurifiées ont été testés en immunohistochimie sur des coupes cryostats de cerveaux et de gonades mâles et femelles. Les essais de marquage avec les sérums anti-P450aroA et B n'ont pas donné de résultats satisfaisants que ce soit dans les cerveaux ou les gonades rejoignant les observations faites avec ces AC en western-blot et en ELISA.

Avec les AC immunopurifiés anti-P450aroB, des immuno-marquages ont été observés au niveau des ovaires ainsi qu'au niveau testiculaire (Figure 10). Dans les ovaires, une zone péri-vitelline est marquée dans certains ovocytes en développement et pourrait correspondre à la zona radiata. Dans les testicules, l'AC anti-P450aroB marque de petites cellules en périphérie des lobules testiculaires qui pourraient correspondre à des spermatogonies ou des spermatocytes. Ces marquages gonadiques mériteraient d'être approfondis. Cependant, chez le poisson zèbre, l'analyse de l'expression du gène *cyp19a* en hybridation *in toto*, montre une expression dans la couche folliculaire des ovocytes en vitellogenèse (Goto-Kazeto *et al.*, 2004). Par ailleurs, les quelques travaux relatant la localisation d'enzymes de la stéroïdogénèse dans les gonades chez le poisson situent l'expression des protéines P450 11A1, 3 $\beta$ -HSD et P450c17 dans le tissu testiculaire interstitiel probablement dans les cellules de Leydig (Kobayashi *et al.*, 1998). Enfin, des travaux récents menés au laboratoire à l'aide d'un AC anti-P450c17 de poisson zèbre montrent clairement que la protéine P450c17 s'exprime dans les cellules péri-ovocytaires et dans le tissu interstitiel des gonades femelles et mâles respectivement (Brion, communication personnelle). L'ensemble de ces données n'est pas en faveur de marquages gonadiques spécifiques d'une protéine P450 aromatasase avec l'AC anti-P450aroB.

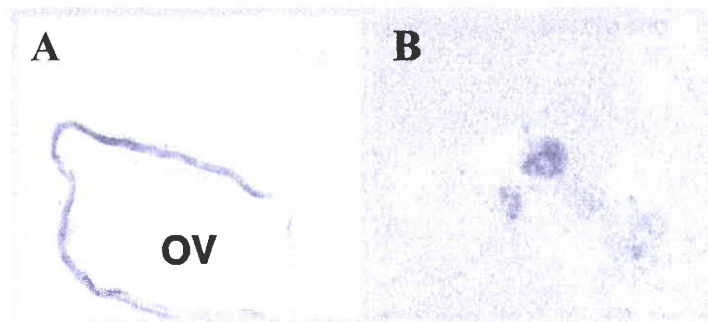


Figure 10 : Essais de marquages immunohistochimiques des protéines aromatase B sur des coupes cryostatés de gonades femelles et mâles de poisson zèbre avec les anticorps immunopurifiés anti-P450aroA et anti-P450aroB. (A) anticorps anti-P450aroB dilué au 1 :1000 ème utilisé sur coupe d’ovaire de poisson zèbre (x 40). (B) anticorps anti-P450aroB dilué au 1 :2500 ème utilisé sur coupe de testicule de poisson zèbre (x 40). OV : ovocyte en vitellogenèse.

Les résultats les plus significatifs que nous avons obtenus concernent les marquages dans les cerveaux avec l’ AC immunopurifié anti-P450aroB. Les résultats de ces travaux ont permis de déterminer la localisation et la nature des cellules exprimant la P450aroB dans le cerveau du poisson zèbre<sup>1</sup>.

De façon similaire à ce qui a été trouvé chez le poisson crapaud à nageoires unies (Forlano *et al.*, 2001) et chez la truite arc-en-ciel (Menuet *et al.*, 2003), l’expression de l’aroB chez le poisson zèbre est restreinte aux cellules gliales radiales (Figure 11). Nos résultats confirment que chez le poisson zèbre ainsi que chez deux autres espèces de poissons téléostéens (Forlano *et al.*, 2001; Menuet *et al.*, 2003), l’aroB n’est pas exprimée dans les neurones comme c’est le cas chez les mammifères et les oiseaux (Lephart, 1996; Lephart, 1997).

---

<sup>1</sup> Travaux menés en collaboration avec le laboratoire d’endocrinologie moléculaire de la reproduction de l’université de Rennes 1.

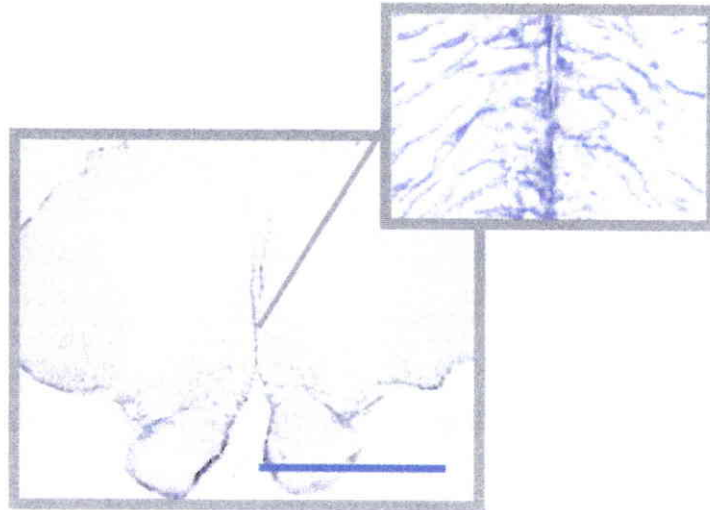


Figure 11 : Coupe transversale de cerveau de poisson zèbre mâle au niveau des bulbes olfactifs postérieurs et du télencéphale. Le marquage immunohistochimique à l'aide de l'anticorps anti-P450aroB (dilution 1:2500) correspond à des cellules gliales radiaires. La barre bleue correspond à 500  $\mu\text{m}$ .

Chez les mammifères, ces cellules sont connues pour guider la migration des neurones des zones ventriculaires jusqu'aux zones plus profondes du cerveau (Parnavelas and Nadarajah, 2001), et elles pourraient également donner naissance, par division asymétrique, aux neurones qui ensuite utilisent les extensions radiaires pour migrer dans le cerveau (Campbell and Gotz, 2002; Noctor *et al.*, 2002; Anthony *et al.*, 2004). Au contraire des mammifères, les cellules gliales radiaires sont persistantes chez les poissons adultes, une caractéristique qui pourrait être liée à la capacité du cerveau des poissons à croître et à se régénérer à l'âge adulte (Gelinas *et al.*, 1998; Forlano *et al.*, 2001). La forte expression de l'aroB dans ces cellules est particulièrement pertinente au regard du rôle de l'œstradiol dans la neurogenèse. Alors qu'en condition normale, les activités aromatasases chez les mammifères sont les plus fortes durant la neurogenèse et restreintes aux neurones, de fortes expressions aromatasases sont détectées en périphérie des zones lésées. Ces résultats semblent indiquer que la production locale d'œstradiol par l'aroB est un facteur clé dans la neurogenèse en condition normale ou lors d'atteintes cérébrales et fait du poisson un excellent modèle biologique pour l'étude de la neurogenèse.

### 1.2.3 Quantification des activités enzymatiques P450aromatases dans le cerveau et les gonades de poissons zèbres et de truites arc-en-ciel

Nos travaux ont permis de mettre en place la méthode de l'eau tritiée (Thompson and Siiteri, 1974) permettant de quantifier les activités aromatasés dans le cerveau et les gonades chez la truite arc-en-ciel et le poisson zèbre. Le développement de cette méthode a consisté à vérifier la spécificité des mesures et à déterminer les conditions optimales de dosage en terme de quantité de protéines, de temps d'incubation et de concentration en substrat pour chacun des tissus étudiés et pour chacune des espèces. Les données relatives à ces développements sont présentées dans l'article 1 pour le poisson zèbre et l'article 2 pour la truite arc-en-ciel.

Le tableau IX présente les principales conditions d'essais retenues pour chacune des espèces.

Tableau IX : Conditions optimales de dosage des activités aromatasés retenues pour la truite et le poisson zèbre.

	Tissu	Fraction	Quantité de protéines	Temps d'incubation	Concentration en substrat
<b>Truite</b>	Cerveau	Microsomes	0.2 mg	30 min	75 nM
	Ovaires	Microsomes	0.2 mg	30 min	75 nM
<b>Poisson zèbre</b>	Cerveaux	S9	0.1 mg	60 min	10 nM
	Ovaires	Microsomes	0.2 mg	60 min	150 nM

Dans ces conditions d'essais, le dosage d'activité est spécifique de la réaction d'aromatation (Figure 12). Les activités sont proportionnelles à la quantité de protéines totales et au temps d'incubation ce qui permet de normaliser les résultats d'activités par la quantité de protéine et le temps d'incubation (Figure 1 de l'article 2). Les activités s'expriment alors en fmol d'œstrone formé/mg/min. La méthode que nous avons développée permet de détecter la formation de faibles quantités d'œstrogènes par milligramme de protéines et par minute (limite de détection de l'ordre du fmol/mg/min). De plus, c'est une méthode répétable et reproductible (coefficients de variation intra- et inter-essais variants de 3,5 à 8,2% et de 8,2 à 17,3 % respectivement).

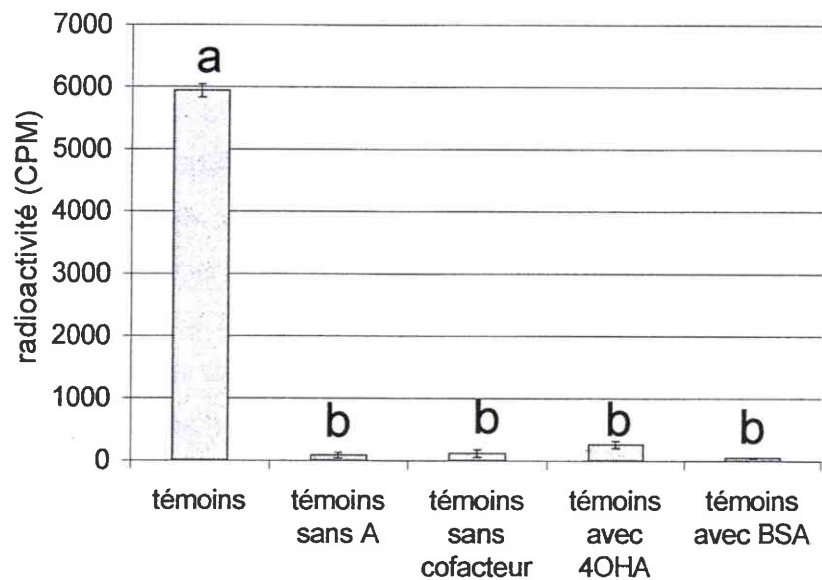


Figure 12 : Représentation de la spécificité des mesures d'activités aromatasés dans les microsomes d'ovaires de truites arc-en-ciel adultes. Témoin : 0.2 mg de microsomes d'ovaires de truite incubé 30 min avec 75 nM de 1-beta-[<sup>3</sup>H]androsténédione. Témoin sans A : témoin sans substrat radiomarqué ; Témoin sans cofacteur : témoin sans le cofacteur ni le système de régénération ; Témoin avec 4-OHA : témoin avec de la 4-hydroxyandrosténédione (inhibiteur spécifique de l'aromatase) ; Témoin avec BSA : témoin avec 1 mg d'albumine de sérum bovin à la place des microsomes. Des lettres différentes indiquent une différence statistiquement significative entre les moyennes (Test t de Student, p < 0.05).

Cette méthode nous a permis de caractériser d'un point de vue enzymatique les P450aromatases cérébrales et gonadiques chez ces deux espèces. Les données relatives à la caractérisation des P450aromatases sont présentées dans le tableau X. A notre connaissance aucune donnée équivalente n'est disponible dans la littérature concernant la caractérisation des enzymes à cytochrome P450aromatases gonadiques et cérébrales chez la truite arc-en-ciel et le poisson zèbre.

Tableau X : Paramètres cinétiques (Km et Vmax) dans les cerveaux et les ovaires chez la truite arc-en-ciel et le poisson zèbre avec l'androsténédione comme substrat. Comparatif avec les valeurs de Km et Vmax trouvées dans la littérature pour d'autres espèces.  $\mu$ S : microsomes.

<i>Espèce</i>	<i>Fraction / tissu</i>	<i>Km</i> ( <i>nM</i> )	<i>Vmax</i> ( <i>fmol/mg/min</i> )	<i>Références</i>
Truite	$\mu$ S ovaires	7.5 $\pm$ 1.1	453.7 $\pm$ 24.5	Article 2
	$\mu$ S cerveau	9.9 $\pm$ 2.6	51.0 $\pm$ 1.5	Article 2
Poisson zèbre	$\mu$ S ovaires	27.82 $\pm$ 7.59	22.46 $\pm$ 7.63	Notre étude
	S9 cerveau	2.46 $\pm$ 0.02	91.7 $\pm$ 44.9	Notre étude
Truite	$\mu$ S ovaires	435	71.1	(Shilling <i>et al.</i> , 1999)
Poisson zèbre	P450aroA dans les cellules COS-1	104 $\pm$ 42	/	(Tong <i>et al.</i> , 2001)
	P450aroB dans les cellules COS-1	26 $\pm$ 9	/	(Tong <i>et al.</i> , 2001)
Loup de mer	$\mu$ S ovaires	3.4 $\pm$ 0.5	39.67 $\pm$ 6.67	(Gonzalez and Piferrer, 2002)
	$\mu$ S cerveau	4.1 $\pm$ 0.5	221.0 $\pm$ 48.3	(Gonzalez and Piferrer, 2002)
Poisson rouge	$\mu$ S cerveau	8.2 $\pm$ 2.4	189.4 $\pm$ 52.9	(Zhao <i>et al.</i> , 2001)
Poisson rouge	P450aroA dans les cellules CHO	2.3 $\pm$ 0.4	60.8 $\pm$ 4.2	(Zhao <i>et al.</i> , 2001)
	P450aroB dans les cellules CHO	2.6 $\pm$ 0.9	187.0 $\pm$ 25.0	(Zhao <i>et al.</i> , 2001)

Chez le poisson zèbre, les affinités (Km) de l'aromatase pour l'androsténédione calculées sont plus élevées dans les microsomes d'ovaires que dans les S9 de cerveaux, ce qui semblerait indiquer une affinité plus grande de l'aromatase cérébrale pour l'androsténédione comparée à l'aromatase gonadique (Tableau X). Cette différence rejoint les résultats de Tong *et al.* (2001) qui ont mesuré un Km supérieur pour la P450aroA de poisson zèbre exprimée constitutivement dans des cellules COS-1, par rapport à la P450aroB. Toutefois on ne peut exclure la possibilité que cette différence soit liée au fait que les mesures aient été réalisées dans des fractions différentes (S9 et microsomes). Contrairement au poisson zèbre, nos résultats ne montrent aucune différence significative entre l'affinité de l'aromatase cérébrale pour l'androsténédione et celle de l'aromatase ovarienne chez la truite arc-en-ciel (article 2, tableau X) ce qui montre que chez la truite, l'affinité des P450aromatases pour l'androsténédione est similaire dans les deux tissus. Nos valeurs de Km se classent parmi d'autres Km trouvés chez d'autres espèces (Tableau X). Cependant, chez la truite, Shilling *et al.* (1999) ont calculé un Km de 435 nM, ce qui représente une affinité de l'enzyme pour le substrat environ quarante fois plus forte que nos résultats. Aucune explication rationnelle ne peut être avancée pour expliquer une telle différence entre nos résultats et ceux de Shilling. Cependant, il est important de noter que les affinités mesurées dans cette étude sont discordantes comparativement à l'affinité de l'aromatase pour l'androsténédione mesurée chez d'autres espèces.

Concernant les activités catalytiques ( $V_{max}$ ), elles sont plus importantes dans les cerveaux que dans les ovaires chez les deux espèces (Tableau X, article 2). Ces résultats sont en accord avec ceux de Zhao *et al.* (2001) sur le poisson rouge et ceux de Gonzalez et Piferrer (2002) sur le loup de mer, qui révèlent également un  $V_{max}$  plus important dans le cerveau que dans les ovaires. Ces résultats suggèrent une activité catalytique plus importante de l'isoforme cérébrale que de l'isoforme ovarienne. Zhao *et al.* (2001) ont effectivement montré que l'aromatase B de poisson rouge exprimée constitutivement dans des cellules d'ovaires de hamster chinois (CHO) présentait une activité catalytique intrinsèque plus importante que l'aromatase A. Toutefois, dans notre étude, les  $V_{max}$  plus importants mesurés dans les cerveaux de truite et de poisson zèbre, comparativement aux ovaires, sont peut-être le reflet d'une expression plus importante de l'aromatase B dans le cerveau que de l'aromatase A dans les ovaires. Il s'agirait de normaliser les activités par une quantité de protéine aromatase plutôt que par une quantité de protéines totales afin de déterminer les activités catalytiques intrinsèques de chaque isoforme. En l'absence d'anticorps spécifiques anti-P450aroA de poisson zèbre (voir paragraphe I.2.2. des RESULTATS) et d'anticorps anti-P450aroA et B de truite, cette approche n'a pu être mise en œuvre.

### I.3. Conclusions

Lors de la première étape de ce travail de thèse, différentes méthodes ont été développées afin de mesurer l'expression des P450aromatases cérébrale et gonadique chez le poisson zèbre et chez la truite arc-en-ciel. Cette étape de développement méthodologique constituait un préalable indispensable.

Les méthodes permettent la mesure des expressions géniques, protéiques et enzymatiques des aromatasés dans les cerveaux et les gonades chez le poisson. De nouveaux outils moléculaires et biochimiques ont été développés et des données originales sur la caractérisation des aromatasés ont été acquises. A l'aide d'un anticorps spécifique anti-P450aromatase B de poisson zèbre, le poids moléculaire (47Kda) de l'aroB ainsi que sa localisation cellulaire dans le cerveau (cellules gliales radiales) ont été déterminés. La méthode de quantification des activités enzymatiques a permis d'apporter des informations originales concernant les caractéristiques cinétiques enzymatiques des aromatasés chez la truite arc-en-ciel et le poisson zèbre ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ). L'ensemble de ces données vient donc compléter la caractérisation biochimique et moléculaire des aromatasés chez le poisson disponible dans la littérature.



Dans une seconde partie, ces méthodes ont été utilisées afin d'étudier les expressions des aromatasés chez les poissons en situation de référence, i.e. en l'absence de contamination.

## **II. CARACTERISATION DES EXPRESSIONS / ACTIVITES AROMATASES CHEZ LE POISSON ZEBRE**

### **II.1. Objectifs**

Dans cette partie, l'objectif était de déterminer à l'aide des méthodes développées précédemment, l'expression des cytochromes P450 aromatasés A et B chez le poisson zèbre au cours du développement larvaire et au stade adulte en dehors de toute contamination par des substances chimiques. Dans ce but, des poissons d'âge et/ou de sexe définit issus de notre élevage ont été utilisés.

### **II.2. Résultats et discussions**

#### *II.2.1 Caractérisation des expressions des gènes *cyp19a* et *cyp19b* chez les larves et les adultes sexuellement mûres*

L'analyse de l'expression des gènes *cyp19a* et *cyp19b* dans les homogénats de larves et chez les adultes est présentée dans les figures 13 et 14 respectivement. Le lecteur est invité aussi à se référer aux articles 1 et 4 dans lesquelles la caractérisation de l'expression des gènes *cyp19* chez les femelles et les mâles est rapportée.

Dans nos conditions expérimentales, l'expression des gènes *cyp19a* et *b* (normalisée par la  $\beta$ -actine) chez le poisson zèbre débute très tôt (dès 7 jpf) et fluctue au cours du développement avec des profils d'expression similaires pour les deux gènes (Figure 13). Les fluctuations observées dans notre étude correspondent à celles mises en évidence par Trant *et al.* (2001) chez des poissons zèbres aux mêmes stades de développement à l'aide d'une méthode de RT-PCR. Cependant, les variations d'expression des gènes cibles sont influencées par les variations de l'expression de la  $\beta$ -actine (Figure 13, Trant *et al.*, 2001) ce qui rend difficile la comparaison des expressions d'un stade de développement à un autre.

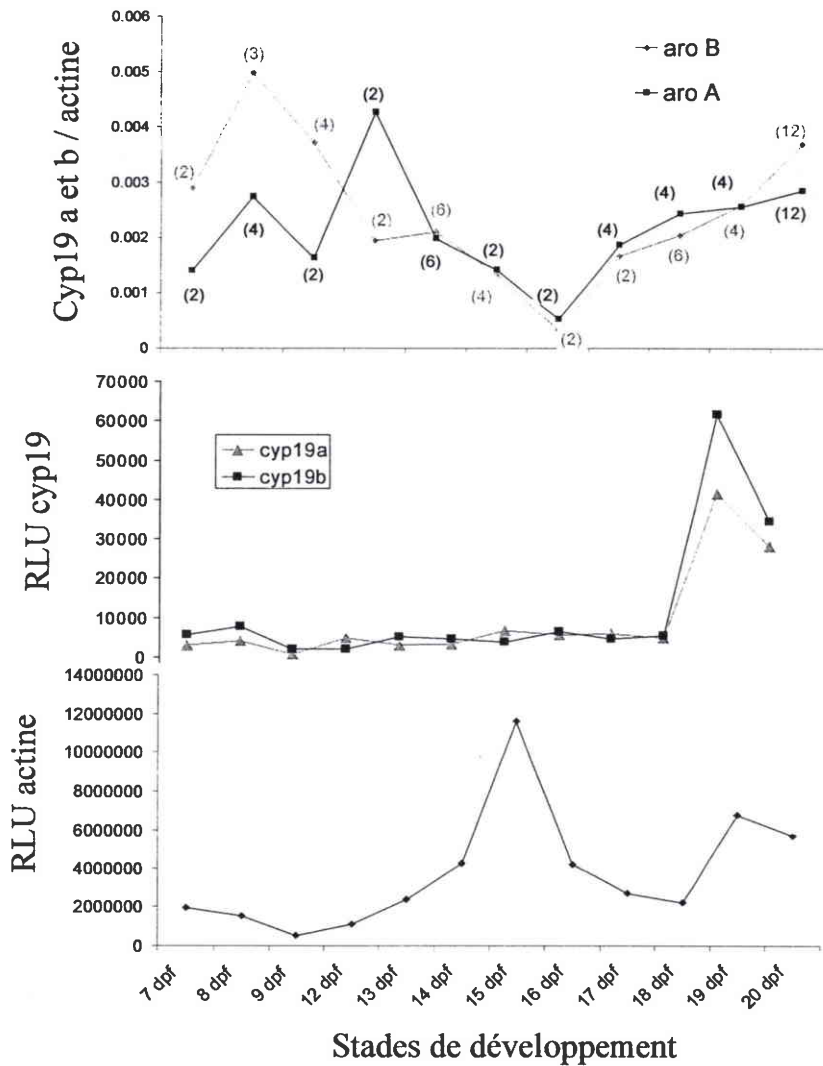


Figure 13 : Expression basale des gènes cyp19a et cyp19b chez les larves de poissons zèbres. Sur le graphique du haut, l'expression de ces gènes est normalisée par l'expression du gène de la beta-actine. Le nombre de mesure (pools de 10 larves) est indiqué entre parenthèses pour chaque stade et chaque gène. Chaque mesure est réalisée en dupliques de lecture. Le graphique du milieu correspond à l'expression des gènes cyp19 non normalisée par l'actine (exprimée en RLU). Le graphique du bas présente les variations de l'expression du gène de l'actine au cours du développement (exprimée en RLU).

On peut cependant dire que quelque soit le stade considéré, l'expression des gènes cyp19 est faible, similaire pour chacune des isoformes et suit un profil identique. Il convient de noter que les données concernant l'expression des gènes cyp19a et cyp19b chez le poisson zèbre aux stades embryonnaires et larvaires sont disparates et parfois contradictoires. Alors que Kishida et Callard (2001) observent une expression prédominante du cyp19b et des profils très distincts des deux isoformes chez les embryons et larves âgés de 1 à 5 jpf, Sawyer *et al.* (2006) déterminent des profils d'expression identiques et une absence de différence dans

l'abondance en transcrits des gènes *cyp19a* et *b* à 5 jpf. A ces mêmes stades de développement, Trant *et al.* (2001) montrent une prédominance de l'isoforme A qui persiste jusqu'à 40 jpf. A un stade de développement comparable (i.e. 38 jpf), Fenske et Segner (2004) notent une expression plus importante de l'isoforme B. L'ensemble de ces études s'accorde donc sur une expression précoce des gènes *cyp19a* et *cyp19b* au cours du développement, les différences observées pouvant être liées aux différentes méthodes d'analyse utilisées. Dans notre étude, les gènes ont été étudiés sur des homogénats de pools de 10 larves entières, alors que dans l'étude de Trant *et al.* (2001) et Fenske et Segner (2004), les analyses ont été réalisées en individuel soit sur larve entière (Trant *et al.*, 2001) soit en mesurant les gènes dans la tête et le tronc des individus (Fenske and Segner, 2004). Cette approche plus fine a conduit certains auteurs à distinguer deux groupes distincts d'individus sur la base de l'expression du gène *cyp19b* : un groupe exprimant fortement le gène *cyp19b* et un autre exprimant faiblement ce gène (Trant *et al.*, 2001). Ces auteurs suggèrent que cette expression différentielle du *cyp19b* joue un rôle décisif dans la différenciation sexuelle des poissons zèbres. Cette dichotomie d'expression du gène *cyp19b* n'est cependant pas retrouvée par Fenske et Segner (2004) qui notent par ailleurs une forte variabilité inter-individuelle d'expression de ce gène ainsi que du gène *cyp19a*. A ce jour, il est difficile de déterminer le rôle spécifique de chacune des isoformes dans le processus de différenciation. Cependant, il a été montré par hybridation *in situ* que durant la différenciation de la gonade en testicule, l'expression du gène *cyp19a* diminue dans ce tissu alors que cette expression persiste dans la gonade lors de la différenciation en ovaire. L'inhibition de l'aromatase gonadique pourrait donc être impliquée dans la transformation de la gonade indifférenciée en testicule (Rodriguez-Mari *et al.*, 2005).

Chez les adultes sexuellement mûres, les mesures de quantification relative des ARNm des gènes *cyp19a* et *cyp19b* montrent que les deux gènes s'expriment dans le cerveau, les ovaires et les testicules des mâles et des femelles de poissons zèbres (Figure 14, article 1, article 4). Le cerveau des mâles et des femelles exprime majoritairement le gène *cyp19b* (ratio B:A  $\approx$  45:1). Dans les ovaires, c'est le gène *cyp19a* qui est majoritairement exprimé (ratio A:B  $\approx$  4:1). Les profils d'expression des isoformes A et B de l'aromatase dans les cerveaux des mâles et des femelles ainsi que dans les ovaires que nous avons mesurés à l'aide de la méthode de l'ADN braché sont en parfaits accord avec ceux déterminés par Trant *et al.* (2001) et Sawyer *et al.* (2006) chez le poisson zèbre adulte. Ils confirment que chez les poissons téléostéens, l'aromatase B est prédominante dans le cerveau, et l'aromatase A dans

les ovaires (Gelinas *et al.*, 1998; Tchoudakova and Callard, 1998; Callard *et al.*, 2001; Sawyer *et al.*, 2006; Villeneuve *et al.*, 2006).

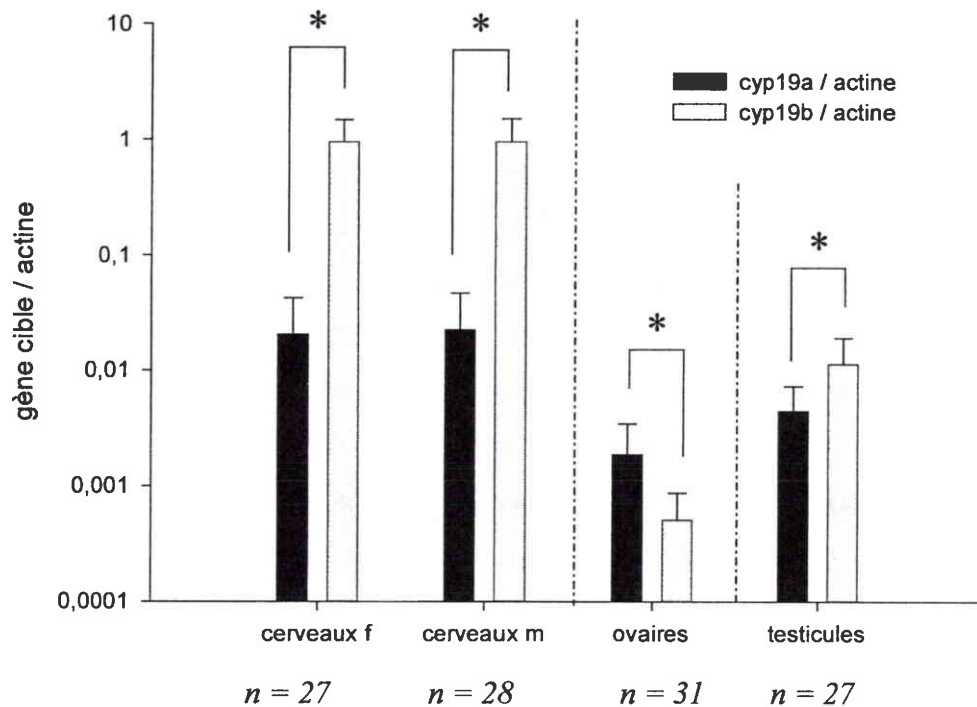


Figure 14 : Abondance des transcrits des gènes *cyp19a* et *cyp19b* dans les cerveaux et les gonades de poissons zèbres mâles et femelles. L'expression des gènes cibles est normalisée par l'expression du gène de la beta-actine dans le même échantillon. n : nombre d'échantillons analysés. \* indiquent une différence statistiquement significative entre les moyennes (Test t de Student,  $p < 0.05$ ).

Dans les testicules, c'est le gène *cyp19b* qui est majoritairement exprimé (ratio B:A  $\approx$  2.5:1). Ce ratio correspond à ce qui est observé par Sawyer *et al.* (2006) dans les testicules de poissons zèbres. Chez le tilapia, seul le gène *cyp19b* s'exprime (Chang *et al.*, 2005). Cependant, il convient de noter que dans les testicules de poisson zèbre, aucune différence dans l'abondance des transcrits *cyp19a* et *cyp19b* n'a été observée par Trant *et al.* (2001) et Fenske et Segner (2004).

La comparaison de l'expression du gène *cyp19b* dans le cerveau des mâles et des femelles ne montre aucun dimorphisme sexuel (ratio *cyp19b* mâles / *cyp19b* femelles  $\approx$  1:1) confirmant les études menées chez cette espèce (Trant *et al.*, 2001; Fenske and Segner, 2004; Sawyer *et al.*, 2006). La comparaison des résultats entre les gonades mâles et femelles est plus délicate. En effet, lorsque l'expression des gènes *cyp19* est normalisée par l'actine, cette expression est plus importante dans les testicules que dans les ovaires ce qui est contradictoire avec le

dimorphisme sexuel en faveur des femelles qui est mis en évidence chez ce poisson (Trant *et al.*, 2001; Fenske and Segner, 2004; Sawyer *et al.*, 2006). Cependant, lorsque les résultats sont normalisés par  $\mu\text{g}$  de tissu (Figure 15), on observe que l'expression des gènes *cyp19* est plus importante dans les ovaires que dans les testicules. Cette différence reflète la difficulté de comparer des résultats d'expression d'un tissu à un autre, les niveaux d'actine mesurés étant très différents dans les ovaires et les testicules. Le problème de la normalisation des données par un gène de ménage a été soulevé récemment lors de l'étude de l'expression de gène de la stéroïdogenèse au niveau ovarien chez le poisson zèbre (Ings and Van Der Kraak, 2006).

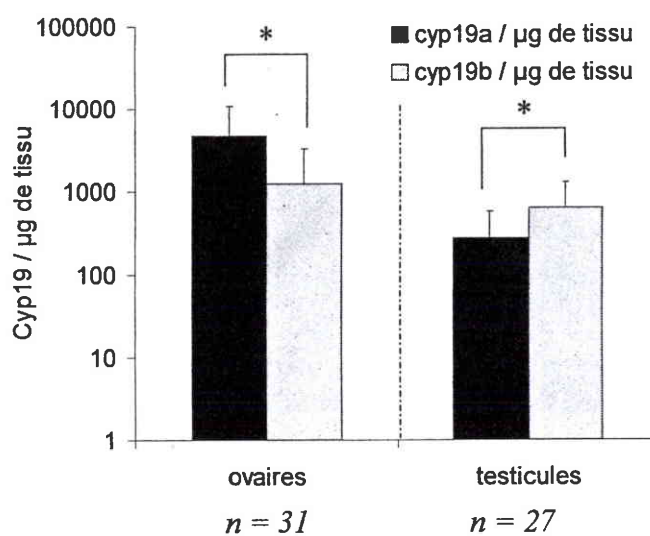


Figure 15 : Abondance des transcrits des gènes *cyp19a* et *cyp19b* dans les gonades de poissons zèbres mâles et femelles. L'expression des gènes cibles est normalisée par la quantité de tissu. n : nombre d'échantillons analysés. \* indiquent une différence statistiquement significative entre les moyennes (Test t de Student,  $p < 0.05$ ).

### II.2.2 Caractérisation de l'expression de la P450aroB chez les larves et les adultes sexuellement matures

Les expérimentations concernant la caractérisation de l'expression de la protéine P450aroB réalisées en collaboration avec le laboratoire d'Endocrinologie Moléculaire de la Reproduction à Rennes ont permis de mettre en évidence les cellules exprimant l'aromatase dans le cerveau des poissons zèbres adultes. Chez le poisson zèbre, l'aromatase est exprimée exclusivement dans les cellules gliales radiaires (Menuet *et al.*, 2005, Figure 16). Ces mêmes cellules sont à l'origine de l'expression de l'aromatase chez la truite et le poisson crapaud à nageoires unies (Forlano *et al.*, 2001; Menuet *et al.*, 2003). En revanche, aucune expression

de la protéine P450aroB n'a été détectée dans le cerveau des larves de poissons zèbres de 20jpf, indiquant que l'expression de l'aroB est plus faible chez les larves que chez les adultes (Figure 16).

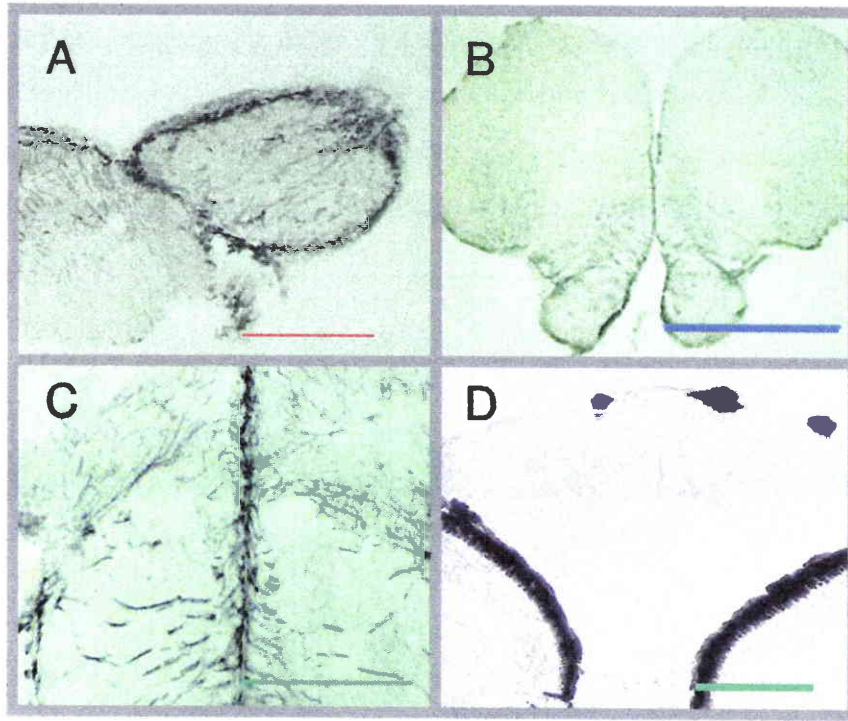


Figure 16 : Marquages immunohistochimiques de coupes de cerveaux de poisson zèbre à l'aide de l'anticorps anti-P450aroB. A : coupe longitudinale de cerveau de mâle adulte au niveau des bulbes olfactifs. B : coupe transversale de cerveau de mâle adulte au niveau des bulbes olfactifs postérieurs et du télencéphale. C : coupe transversale de cerveau de mâle adulte au niveau de l'aire pré-optique. D : coupe transversale de cerveau de larve de 20 jours post fertilisation. Les marquages immunohistochimique révélés chez les adultes correspondent aux cellules gliales radiaires. La barre verte correspond à 100  $\mu\text{m}$ , la rouge à 200  $\mu\text{m}$  et la bleue à 500  $\mu\text{m}$ .

Dans le cadre de notre collaboration avec le laboratoire d'endocrinologie moléculaire de la reproduction de Rennes, les anticorps anti-P450aroB que nous avons développés au laboratoire ont été utilisés pour faire une cartographie fine de l'expression de la protéine dans le cerveau des poissons zèbres adultes (Menuet *et al.*, 2005). Chez le poisson zèbre, l'aromatase est principalement exprimée dans les bulbes olfactifs, le télencéphale, l'aire préoptique et l'hypothalamus (Menuet *et al.*, 2005), ce qui correspond au profil d'expression du gène *cyp19b* chez cette espèce (Chiang *et al.*, 2001; Goto-Kazeto *et al.*, 2004). De plus, les

expérimentations d'immunohistochimie ne montrent aucune différence dans les profils d'expression de la protéine aromatase B entre les mâles et les femelles (Menuet *et al.*, 2005).

Contrairement à ce qui est observé en immunohistochimie, la quantification relative de la protéine aromatase B par ELISA indirecte dans les cerveaux des mâles et des femelles montre qu'il existe un dimorphisme sexuel. En effet, les cerveaux des femelles synthétisent plus d'aromatase B que ceux des mâles (Figure 17), alors qu'aucune différence n'était observée entre les mâles et les femelles ni dans l'expression de la protéine aromatase B en immunohistochimie (mesure non quantitative) ni dans l'expression du gène *cyp19b* (cf paragraphe II.2.1. des RESULTATS). Néanmoins, afin de confirmer ce dimorphisme sexuel dans l'expression de la protéine aroB dans le cerveau, il s'agirait de mettre en place une méthode ELISA quantitative en utilisant comme standard le polypeptide ayant servi à la synthèse des anticorps.

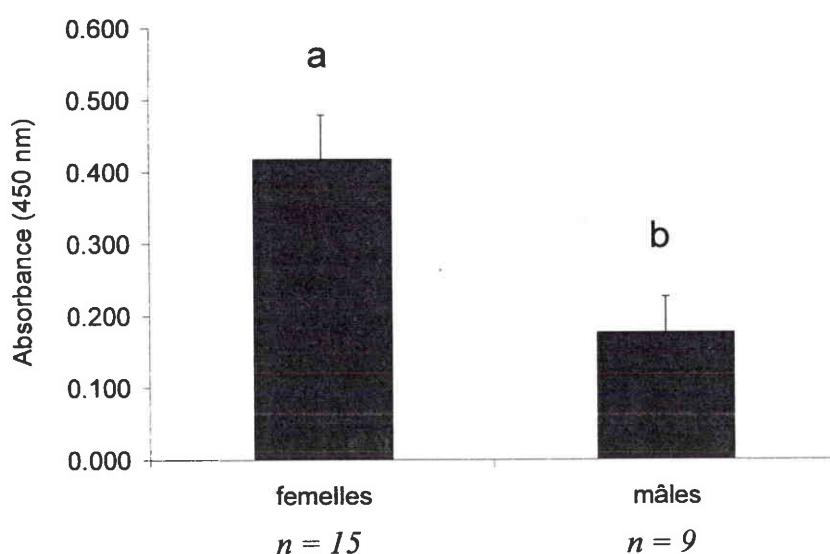


Figure 17 : Quantification relative de la synthèse de la protéine aromatase B dans le cerveau des mâles et des femelles de poissons zèbres adultes. n : nombre d'échantillons analysés.

### II.2.3 Caractérisation des activités aromatasés chez les adultes sexuellement mûres

Les résultats concernant les mesures d'activités aromatasés chez des poissons zèbres témoins sont présentés dans l'article 1 pour les femelles. En ce qui concerne les activités aromatasés chez les mâles, elles sont présentées en détail dans le paragraphe qui suit.

Chez le poisson zèbre, les activités aromatasases sont en moyenne de  $34.0 \pm 25.3$  fmol/mg/min dans les cerveaux femelles (article 1, Figure 18) et de  $8.3 \pm 4.4$  fmol/mg/min dans les cerveaux des mâles (Figure 18). Ces résultats sont cohérents avec la différence de synthèse de la protéine aromatase B observées entre les cerveaux mâles et les cerveaux femelles. Ce type de dimorphisme sexuel dans les activités aromatasases cérébrales est retrouvé chez une autre espèce de poisson : le poisson killi (Patel *et al.*, 2006). Une hypothèse plausible pouvant expliquer ce dimorphisme sexuel pourrait concerner une différence dans les concentrations en androgènes ou en œstrogènes circulants entre les mâles et les femelles, mais cette information n'est pas disponible chez le poisson zèbre.

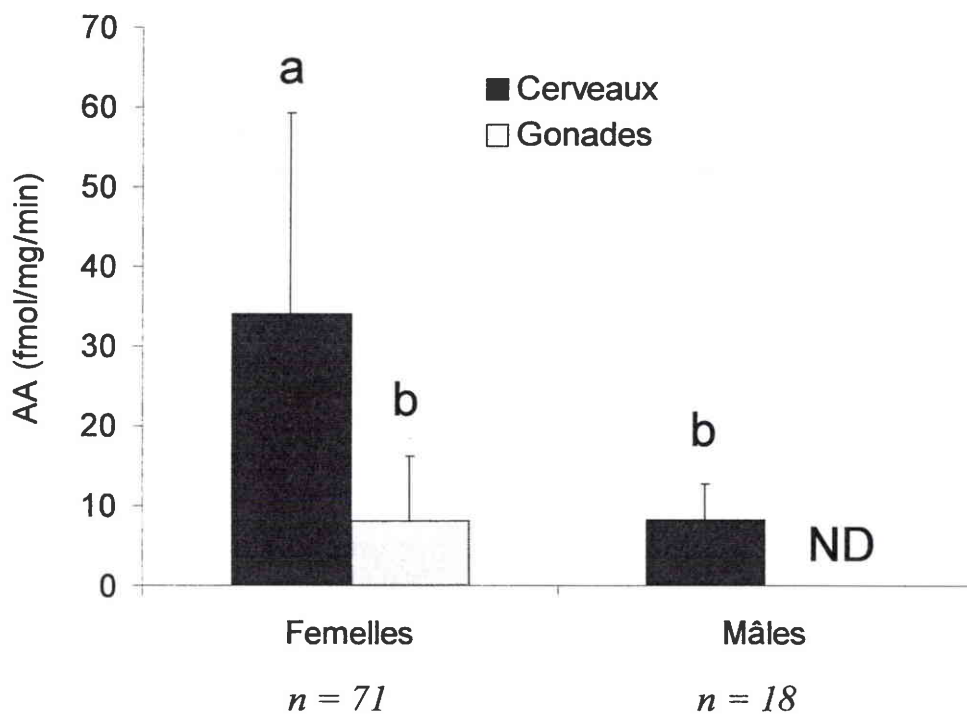


Figure 18 : Niveaux d'activités aromatasases dans les cerveaux et les gonades des poissons zèbres mâles et femelles adultes. Les résultats sont exprimés en moyenne et écart type. ND : non détecté. n = nombre d'échantillons analysés.

Dans les ovaires, les activités aromatasases mesurées sont en moyenne de  $8.1 \pm 8.2$  fmol/mg/min (article 1). On retrouve donc bien des activités aromatasases plus importantes dans les cerveaux que dans les ovaires. L'ensemble de ces résultats est cohérent avec des mesures faites chez d'autres espèces de poissons (cf Tableau IV du paragraphe IV.4.1 de la SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE) (Pasmanik and Callard, 1988; Lee *et al.*, 2000; Ankley *et al.*, 2002; Gonzalez and Piferrer, 2003; Contractor *et al.*, 2004; Villeneuve *et al.*, 2006). En revanche, les seules données disponibles sur les activités aromatasases chez le poisson zèbre à l'heure actuelle sont très disparâtres. En effet, les données disponibles sur les activités



aromatases chez le poisson zèbre varient d'un facteur 10, ou alors ne sont pas normalisées classiquement par une quantité de protéine mais par cerveau, ce qui empêche toute comparaison avec nos données expérimentales (Andersen *et al.*, 2003; Andersen *et al.*, 2004; Andersen *et al.*, 2006). Notre étude apporte donc des informations originales sur les niveaux d'activité aromatase chez le poisson zèbre.

Dans les testicules, aucune activité aromatase n'a pu être mise en évidence malgré une expression des deux gènes codant pour l'aromatase (Figure 18). Cette absence d'activité aromatase au niveau testiculaire a été aussi observée chez la truite (notre étude, résultats non montrés) ainsi que chez le loup de mer (Gonzalez and Piferrer, 2003). A ce stade, nous ne savons pas si cette absence d'activité aromatase testiculaire est liée à un manque de sensibilité de notre méthode de mesure ou à une absence de transcription des ARNm en protéines fonctionnelles. Cependant, chez d'autres vertébrés, il existe une expression protéique des P450 aromatasés dans les cellules de Leydig et de Sertoli.

#### *II.2.4 Facteur influençant les expressions / activités aromatasés*

Une forte variabilité inter-individuelle a été observée dans les expressions et activités aromatasés mesurées chez le poisson zèbre. Cette forte variabilité a été observée chez d'autres espèces tant au niveau de l'expression des gènes que des activités enzymatiques. Chez le vairon à tête de boule, Halm *et al.* (2002) notent une différence d'un facteur 100 dans l'expression des ARNm de *cyp19b* dans les ovaires de femelles de maturité sexuelle identique. A la même période de reproduction, les activités aromatasés ovariennes varient d'un facteur 5 chez des poissons rouges femelles (Pasmanik and Callard, 1988). Il existe donc un ou plusieurs facteurs faisant varier les expressions / activités aromatasés.

Chez les poissons à cycle de reproduction annuel, l'expression de l'aromatase varie en fonction de l'état de maturité de la gonade (Trant *et al.*, 1997; Gen *et al.*, 2001). Nos résultats sur les activités aromatasés chez la truite vont dans ce sens (article 2). Nous nous sommes donc interrogés sur les fluctuations d'expression des deux gènes *cyp19*, de la synthèse protéique et des activités aromatasés chez le poisson zèbre au regard de la maturité du poisson. Pour cela nous avons rapporté les expressions / activités aromatasés à une variable reflétant l'état de maturité de la gonade : le GSI.

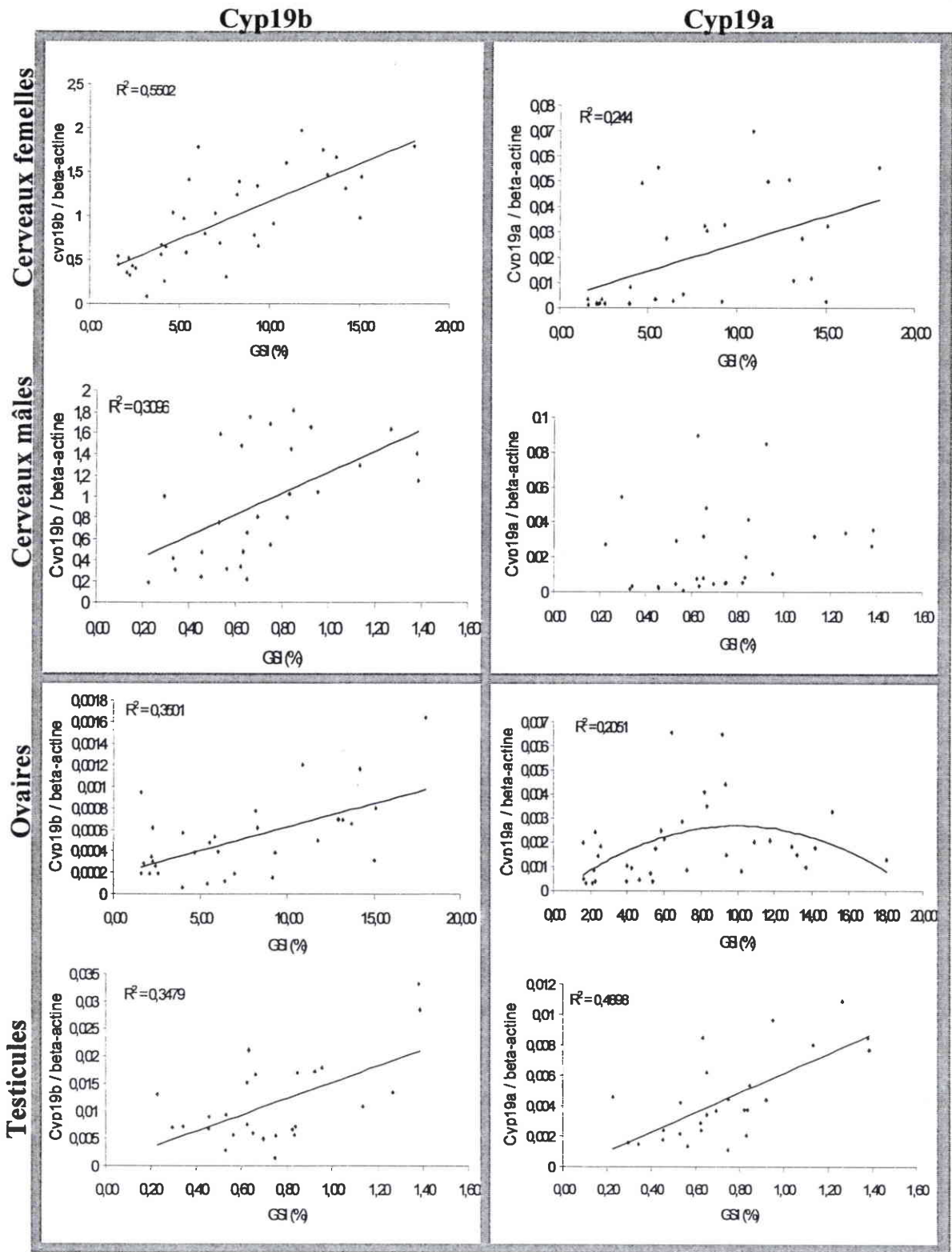


Figure 19 : Expression basale des gènes cyp19a et cyp19b dans les cerveaux et les gonades de poissons zèbres adultes en fonction de l'état de maturité (GSI). L'expression de ces gènes est normalisée par l'expression du gène de la beta-actine. Chaque point représente un individu. Les corrélations ont été établies sous SPSS. Seules les corrélations significatives sont présentées (Test de Pearson pour les corrélations linéaires,  $p < 0.05$ ).

Aux stades adultes, l'expression des gènes *cyp19* semble varier en fonction de l'état de maturité du poisson (Figure 19).

Les corrélations présentées sont faibles mais seules les corrélations significatives sont présentées. L'expression du gène *cyp19b* est corrélée positivement au GSI dans le cerveau des mâles et des femelles (Figure 19). Au niveau protéique, la synthèse de P450aroB augmente également avec le GSI dans le cerveau des femelles mais pas des mâles (Figure 20). Chez le vairon à tête de boule, il existe également une corrélation positive entre l'expression du gène *cyp19b* dans le cerveau des femelles et le GSI (Halm *et al.*, 2002). Ces résultats suggèrent l'existence d'un besoin accru en œstradiol dans le cerveau avec l'avancement de la maturité sexuelle et la ponte. Toutefois, aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre les activités aromatasés et le GSI dans les cerveaux de poissons zèbres (Figure 21). De plus, il est à noter qu'un poisson peut avoir des activités aromatasés cérébrales 10 fois plus importantes qu'un autre poisson de même GSI. Les raisons de ces différences importantes d'activités aromatasés ne sont toutefois pas connues.

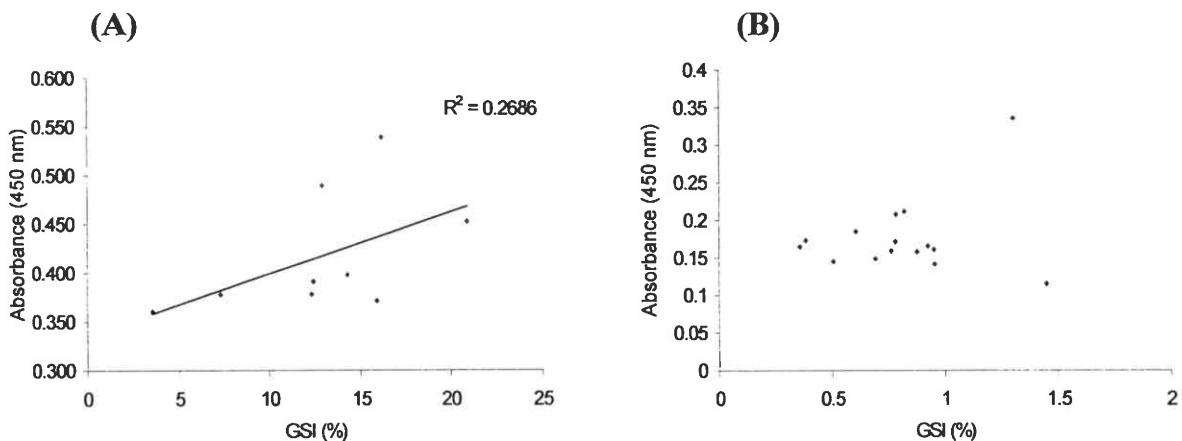


Figure 20 : Expression de la protéine aromatase B dans le cerveau des poissons zèbres femelles (A) et mâles (B) en fonction du GSI. Seules les corrélations significatives sont présentées sur les graphiques (Test de Pearson,  $p < 0.05$ ).  $n = 9$  pour les femelles et 15 pour les mâles.

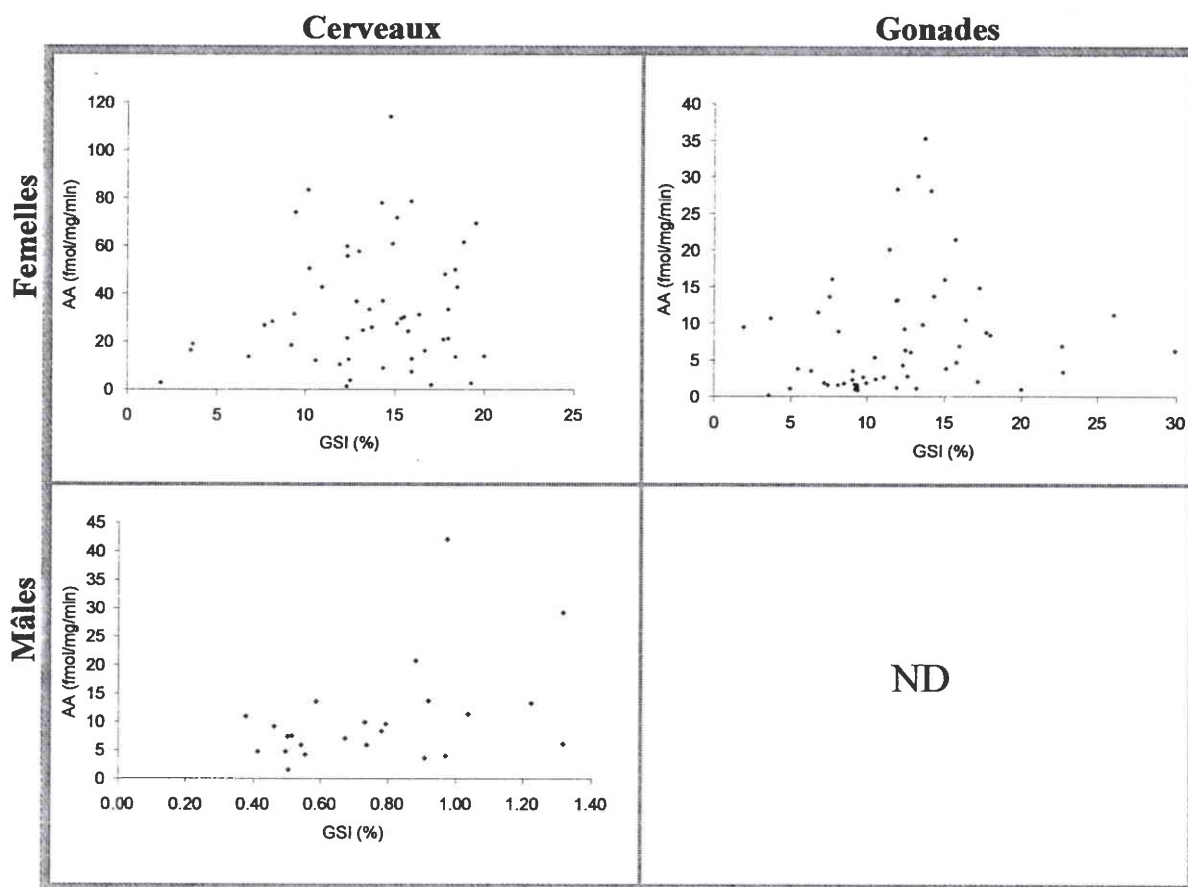


Figure 21 : Activités aromatasés dans les cerveaux (S9) de mâles et de femelles et les ovaires (microsomes) de poissons zèbres en fonction de la maturité sexuelle (GSI). Les activités aromatasés sont données en moyennes  $\pm$  l'erreur standard. ND : non détecté.  $n = 71$  pour les cerveaux femelles,  $n = 55$  pour les ovaires et  $n = 24$  pour les cerveaux mâles.

Dans les testicules, nous montrons pour la première fois qu'il existe une corrélation linéaire positive entre l'expression des gènes *cyp19a* et *cyp19b*, et le GSI (Figure 19). Chez les mammifères, des études menées sur des modèles de souris déficientes en récepteurs des œstrogènes (ERKO) ou déficientes en aromatase (ArKO) montrent que le récepteur des œstrogènes et l'aromatase sont indispensables à la spermatogenèse (Robertson *et al.*, 1999). Chez les poissons, la présence des récepteurs des œstrogènes de type alpha et beta au niveau testiculaire a été démontré chez la truite (Guiguen *et al.*, 1999) et le poisson zèbre (Menuet *et al.*, 2002). Bien que les activités aromatasés ne soient pas détectées dans les testicules, l'augmentation de l'expression du gène *cyp19b* avec le GSI semble indiquer que la production d'œstradiol dans ce tissu joue un rôle important dans la spermatogenèse chez le poisson zèbre. Dans les ovaires, l'expression du gène *cyp19a* augmente avec la maturité sexuelle du poisson jusqu'à atteindre un maximum pour des GSI d'environ 10%, puis diminue (Figure 19). Les

activités aromatasas ovariennes sont également faibles pour les individus ayant les GSI les plus forts (Figure 21). Chez de nombreuses espèces de poissons, les activités enzymatiques ainsi que l'expression des gènes de l'aromatase fluctuent en fonction du cycle reproducteur (Pasmanik and Callard, 1988; Fukada *et al.*, 1996; Trant *et al.*, 1997; Gelinas *et al.*, 1998; Sampath Kumar *et al.*, 2000; Gen *et al.*, 2001; Gonzalez and Piferrer, 2003). Chez le poisson chat, l'expression de l'aromatase ovarienne augmente pendant la période de vitellogenèse et diminue rapidement après cette période (Trant *et al.*, 1997). La chute de la concentration en œstradiol liée à la diminution de l'expression de l'aromatase paraît nécessaire à la maturation ovocytaire chez les poissons (Patino *et al.*, 2001; Sen *et al.*, 2002; Senthilkumaran *et al.*, 2004). Ce type de profil a bien été mis en évidence chez des espèces synchrones à cycle de reproduction annuel. Le poisson zèbre étant un poisson à cycle court asynchrone, il est plus difficile de mettre en évidence un profil d'expression bien distinct, toutefois, ces résultats vont dans le sens de ce qui est observé chez des espèces de poissons à cycle annuel.

### II.3. Conclusions

Les méthodes développées précédemment nous ont permis de caractériser les expressions des gènes, protéines et activités aromatasas chez le poisson zèbre à différents stades de développement. Les résultats obtenus apportent des informations nouvelles sur la caractérisation des aromatasas chez cette espèce et plus généralement chez les modèles poissons.

En particulier, les données récoltées aux différents niveaux d'expression (gènes, protéines, activités enzymatiques) donnent des informations complémentaires, montrant l'intérêt d'étudier l'expression au niveau moléculaire et biochimique.

De plus, nos résultats mettent clairement en évidence l'influence de facteurs tels que le sexe, le stade de développement et la maturité sexuelle des poissons sur l'expression des aromatasas dans les cerveaux et les gonades. Ces informations sont essentielles pour comprendre et interpréter correctement les données relatives aux effets des substances chimiques. Toutefois, les fortes variabilités inter-individuelles qui ont été observées chez les adultes ne sont pas entièrement expliquées par la maturité sexuelle des poissons. Il s'agirait donc de déterminer si d'autres facteurs biotiques ou abiotiques sont susceptibles de faire varier les expressions / activités aromatasas.

### III. EVALUATION DES PERTURBATIONS DE L'AROMATASE

Après avoir acquis une meilleure connaissance des expressions basales d'aromatase chez le poisson zèbre en condition témoin, nous nous sommes intéressés aux perturbations de ces expressions. Nous avons étudié les effets de différentes molécules, *in vitro* et *in vivo*, chez le poisson zèbre et la truite.

#### III.1. Perturbation des aromatasés par deux molécules modèles : l'œstradiol (E2) et l'androstatriènedione (ATD)

##### *III.1.1 Objectif*

Dans cette partie, l'objectif était d'étudier les effets de deux substances ayant des modes d'actions différents sur l'expression et les activités aromatasés chez le poisson zèbre exposé *in vivo*. Les molécules choisies sont : l'œstradiol, produit de la réaction d'aromatation, dont le rôle dans la régulation de l'aromatase cérébrale est connu, et l'ATD, un inhibiteur stéroïdien de l'aromatase.

Les effets de ces deux molécules sur les expressions / activités aromatasés chez les femelles sont présentés en détail dans l'article 1. Les résultats concernant les effets de l'E2 sur les expressions des gènes *cyp19* chez les mâles sont présentés dans l'article 4. Les effets de l'ATD chez les mâles sont quant à eux présentés dans le paragraphe III.1.3.2. qui suit.

##### *III.1.2 Méthodologie*

Les protocoles expérimentaux sont présentés en détail dans l'article 1 et l'article 4. La démarche expérimentale globale est présentée, quant à elle, par la figure 22.

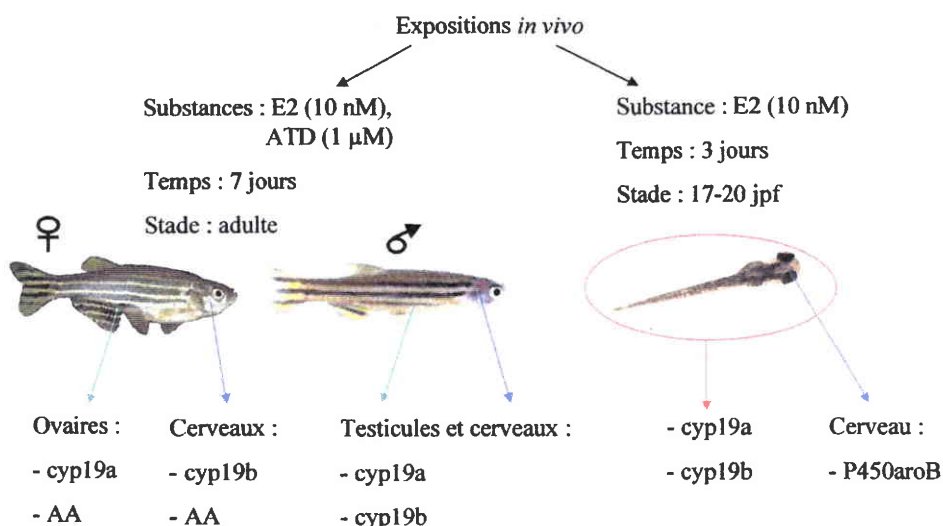


Figure 22 : Schéma de la démarche expérimentale suivie lors des expositions à l'œstradiol (E2, 10 nM) et à l'androstatriènedione (ATD, 1 μM). cyp19a, cyp19b : mesure de l'expression des gènes cyp19a et cyp19b ; P450aroB : mesure de la synthèse de la protéine aromatasase B ; AA : mesure des activités aromatasase ; jpf : jours post-fertilisation.

### III.1.3 Résultats et discussion

#### III.1.3.1. Effets de l'œstradiol sur les aromatasases A et B

L'exposition de poissons adultes à l'E2 (10 nM) n'altère pas l'expression du gène cyp19b et les activités aromatasase dans le cerveau des femelles (article 1, article 4). En revanche, chez les mâles, l'exposition à l'E2 se traduit par une induction significative de l'expression du gène cyp19b dans le cerveau (article 4). Les inductions mesurées sont faibles (facteur d'induction de 2 par rapport aux témoins). Au contraire des adultes, l'exposition de larves à une concentration identique d'E2 durant 72 h conduit à une induction marquée de l'expression du gène cyp19b (article 1). Selon les expériences, les taux d'induction varient de 7 à 16. Ces inductions massives en ARNm cyp19b se traduisent par une induction de la protéine AroB dans les cellules gliales radiaires (article 4) démontrant une synthèse *de novo* de la protéine AroB. Ces inductions sont E2-dépendantes et nécessitent des ERs fonctionnels. En effet, elles sont en partie bloquées par une co-exposition avec de l'ICI-182-780, un antagoniste pur des ERs (article 1). Au niveau moléculaire, il a été clairement démontré que l'induction de l'expression du gène cyp19b de poisson zèbre par l'E2 nécessitait la fixation de ER activés sur les ERE et ½ ERE de la région promotrice du gène cyp19b (Menuet *et al.*, 2005). La

figure 23 résume le mécanisme d'action de l'E2 sur l'aromatase dans les cerveaux des poissons zèbres. Ces résultats sont en parfait accord avec (Kishida *et al.*, 2001) qui ont montré qu'une exposition de 48 heures à une concentration en E2 de 10 nM induit l'expression du gène *cyp19b* chez les embryons de poissons zèbres. Chez les larves, une induction des ARNm ainsi que de la protéine P450aroB est observée dans les cellules gliales radiaires (Menuet *et al.*, 2005).

Les fortes inductions observées chez les larves de poissons zèbres comparativement aux adultes résultent très certainement du fait que les expressions basales chez les larves sont beaucoup moins élevées que chez les poissons adultes, et donc nécessitent une stimulation plus faible pour induire l'expression du gène *cyp19b*. Ces résultats mettent aussi en avant que les effets de l'E2 sur l'expression de l'aromatase B sont différents selon les stades d'expositions.

Dans les testicules, l'E2 n'a aucun effet sur l'expression des gènes *cyp19a* et *cyp19b* (article 4) alors que dans les ovaires, l'E2 inhibe totalement l'expression du gène *cyp19a* ainsi que les activités aromatase chez les adultes (article 1). L'absence d'effet de l'E2 sur l'expression des gènes *cyp19* dans les testicules a été confirmé par une étude récente (Sawyer *et al.*, 2006). De même, l'effet inhibiteur de l'E2 sur l'expression du gène *cyp19a* dans les ovaires a été démontré chez le poisson zèbre (Alberti *et al.*, 2005; Sawyer *et al.*, 2006). Il est intéressant de noter que dans l'étude de Sawyer *et al.* (2006), ces inhibitions sont observées pour des concentrations plus faibles (1 nM) et des temps d'exposition plus courts (2 jours). Une étude a cependant montré que l'E2 (6 mg/kg de nourriture) pouvait induire les activités d'aromatase dans les ovaires de pagres tête noire exposés pendant 6 mois (Lee *et al.*, 2001b). Toutefois, les différences de protocoles d'exposition ne nous permettent pas de comparer nos résultats avec cette étude et il est à noter que l'induction d'activité aromatase chez cette espèce est survenue au moment du changement de sexe du poisson (passage du mâle à la femelle).

Au niveau moléculaire, les mécanismes d'action de l'E2 sur le gène *cyp19a* restent encore à déterminer (Cheshenko *et al.*, soumis). Par ailleurs, l'effet inhibiteur de l'E2 pourrait être attribué à un effet direct sur les ovaires ou indirect *via* un contrôle négatif de l'E2 sur la synthèse des gonadotropines, qui sont connues pour stimuler l'expression et l'activité de l'aromatase dans les follicules ovariens (Gen *et al.*, 2001; Kagawa *et al.*, 2003). Il est intéressant de noter que des concentrations similaires en E2 altèrent l'ovogenèse chez les



poissons, les ovaires étant majoritairement composés d'ovocytes immatures ou caractérisés par un nombre important de follicules atrétiques (Miles-Richardson *et al.*, 1999).

La figure 23 résume le mécanisme d'action de l'E2 sur les aromatasés A et B dans le cerveau et les ovaires des poissons zèbres.

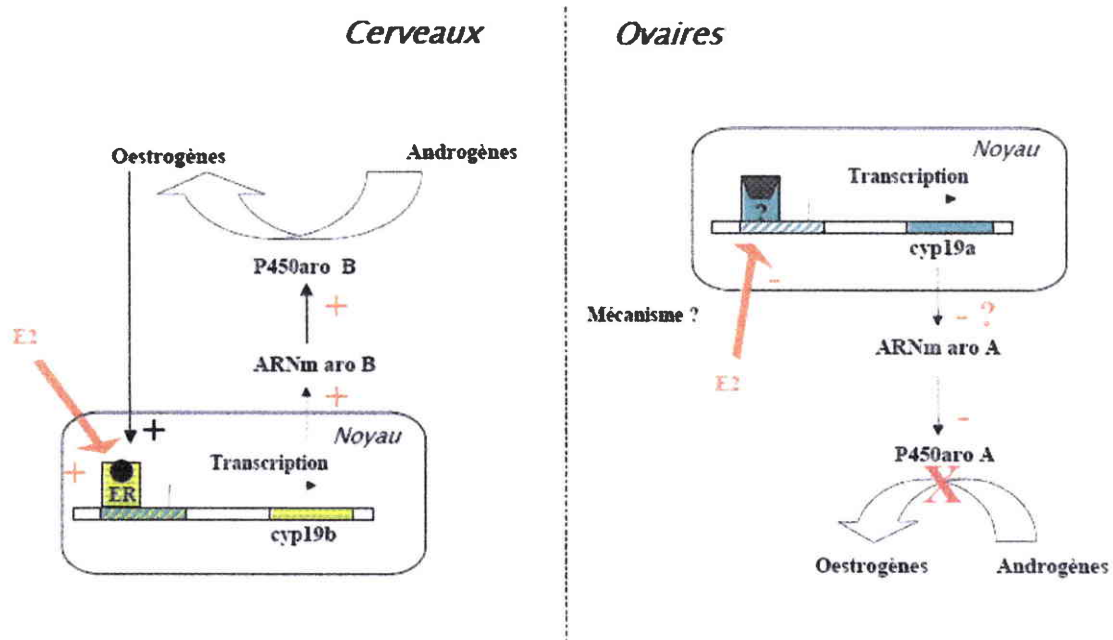


Figure 23 : Schéma des niveaux d'actions de l'oestradiol (E2) sur les aromatasés A et B dans le cerveau et les ovaires chez le poisson zèbre exposé *in vivo*.

### III.1.3.2. Effet de l'ATD sur les aromatasés A et B

L'exposition des poissons femelles à l'ATD inhibe complètement les activités aromatase dans le cerveau à la concentration de  $1\mu\text{M}$  (article 1) en se fixant directement sur le site actif de l'aromatase, et confirme les effets *in vitro* de cette molécule sur les P450 aromatasés de poisson (article 2). En revanche, aucun effet n'est noté sur l'expression du gène *cyp19b* dans le cerveau chez aucun des deux sexes (article 1 pour les femelles, Tableau XI pour les mâles). Il est probable qu'un temps d'exposition plus long aurait permis de voir une diminution de l'expression du gène *cyp19b*, l'inhibition de l'activité aromatase par l'ATD diminuant la stimulation hormonale de l'activité transcriptionnelle du gène *cyp19b*.

Tableau XI : Effets de l'androstatriènedione (ATD, 1 $\mu$ M) sur l'expression des gènes de l'aromatase chez le poisson zèbre adulte mâle après exposition de 7 jours. TS : Témoins solvant. N = 5 poissons par traitement. \*\*: différence significative par rapport au témoin (Test t de Student, p < 0.01).

Tissu	Substance	Cyp19a / beta-actine	Cyp19b / beta-actine
Cerveaux	TS	0,00436 $\pm$ 8,75 <sup>E-04</sup>	0,646 $\pm$ 2,44 <sup>E-01</sup>
	ATD (1 $\mu$ M)	0,00278 $\pm$ 1,31 <sup>E-03</sup>	0,580 $\pm$ 2,02 <sup>E-01</sup>
Testicules	TS	0,00396 $\pm$ 2,64 <sup>E-03</sup>	0,00482 $\pm$ 2,73 <sup>E-03</sup>
	ATD (1 $\mu$ M)	0,00289 $\pm$ 2,45 <sup>E-03</sup>	0,00316 $\pm$ 1,46 <sup>E-03</sup>

Dans les ovaires, l'ATD inhibe aussi complètement les activités aromatase (article 1). Contrairement à l'E2 qui inhibe l'expression du gène cyp19a ainsi que les activités aromatase dans les ovaires, l'ATD n'a aucun effet sur l'expression du gène cyp19a. Ce résultat reflète bien la différence de mécanisme qui existe entre ces deux molécules. En effet l'ATD inhibe les activités aromatase en interagissant directement avec le site actif de l'enzyme, alors que l'E2 semble passer par des mécanismes transcriptionnels.

La figure 24 résume le mécanisme d'action de l'ATD sur les aromatases A et B dans le cerveau et les ovaires des poissons zèbres.

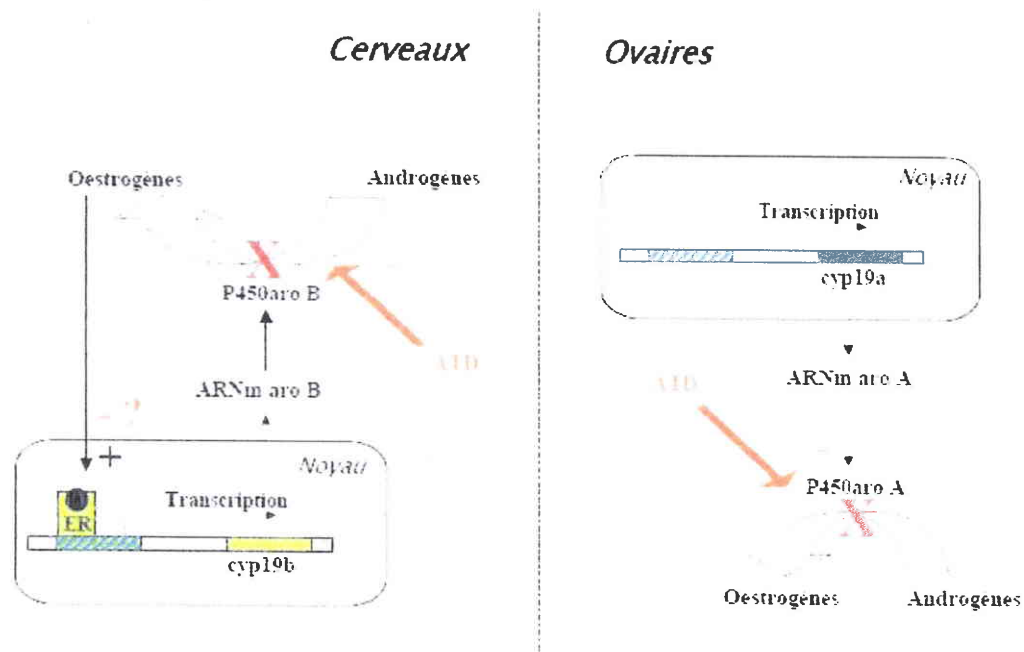


Figure 24 : Schéma des niveaux d'actions de l'ATD sur les aromatases A et B dans le cerveau et les ovaires chez le poisson zèbre exposé *in vivo*.

### III.1.4 Conclusions

Cette étude nous montre que des substances telles que l'E2 et l'ATD sont capables de profondément affecter les expressions et activités aromatasase lors d'expositions d'organismes *in vivo*.

- L'E2 régule différemment l'aromatase cérébrale (induction) et l'aromatase ovarienne (inhibition). La régulation du gène *cyp19b* dans le cerveau est médiée par un mécanisme ER dépendent, et conduit à une synthèse *de novo* de la protéine dans les cellules gliales radiaires. En revanche, les mécanismes moléculaires de l'inhibition de la transcription du gène *cyp19a* ne sont pas connus.
- En comparaison avec les adultes, les larves sont très sensibles à l'induction de l'expression du gène *cyp19b* et de la protéine P450aroB par l'E2. La mesure de l'induction de l'aromatase B constitue donc un marqueur biologique d'exposition des composés œstrogènes mimétiques aux stades larvaires. Au contraire, les adultes sont plus sensibles aux inhibitions de l'expression du gène *cyp19a* que les stades larvaires, et la mesure de ces inhibitions dans les ovaires aux stades adultes constitue donc également un marqueur biologique d'exposition des composés œstrogènes mimétiques.
- Dans les ovaires, les effets de l'E2 et l'ATD aboutissent à une inhibition des activités aromatasase. Deux molécules très différentes conduisent donc à un même effet, bien que les mécanismes sous-jacents ne soient pas les mêmes :
  - inhibition directe des activités enzymatiques par fixation au site actif pour l'ATD,
  - inhibition indirecte par répression de l'expression du gène *cyp19a* pour l'E2.Ce résultat confirme l'intérêt d'avoir une approche complémentaire en étudiant l'expression génique, la synthèse protéique, et les activités enzymatiques.

### III.2. Perturbation des aromatasases par des polluants environnementaux

A l'issue de l'étude réalisée avec les deux molécules modèles, nous avons découpé les travaux en deux parties. D'une part, nous avons étudié les effets *in vitro* de molécules environnementales, et d'autre part leurs effets *in vivo*.

### III.2.1 *Perturbation in vitro des activités aromatasés (article 2)*

#### III.2.1.1. Objectif

Des études *in vitro* menées sur des modèles mammifères montrent que des substances chimiques sont capables de perturber les activités aromatasés (Le Bail *et al.*, 2000; Saitoh *et al.*, 2001; Andersen *et al.*, 2002; Sanderson *et al.*, 2002; Morinaga *et al.*, 2004; Trosken *et al.*, 2004). Chez les poissons, peu de données sont disponibles et concernent essentiellement les effets *in vitro* sur les activités aromatasés dans les ovaires (Monod *et al.*, 1993; Pelissero *et al.*, 1996). Leurs effets sur l'aromatase cérébrale restent cependant à déterminer. Ce travail a donc consisté à fournir une connaissance plus large sur la nature des xénobiotiques capables de perturber les activités aromatasés dans les cerveaux et les gonades de poisson.

#### III.2.1.2. Démarche expérimentale

En raison du nombre important des substances potentiellement mises en cause, un test *in vitro* sur microsomes de cerveaux et d'ovaires a été développé. Pour des raisons pratiques (quantité de matériel biologique, données disponibles dans la littérature) ces tests ont été réalisés sur microsomes de truite et non de poisson zèbre. Une quarantaine de substances appartenant à des familles de nature et de structure chimique variées (HAP, métaux lourds, pesticides) a été criblée pour leur potentiel perturbateur des activités aromatasé. La figure 25 présente le schéma conceptuel de la démarche suivie pour le criblage. Les molécules ont été testées à une concentration de 10  $\mu\text{M}$ , et les substances présentant un effet ont ensuite été testées en dose-effet afin de déterminer leurs CE50.

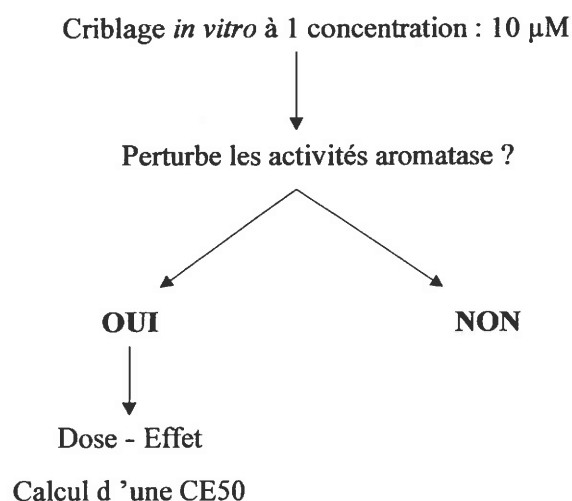


Figure 25 : Schéma conceptuel de la démarche expérimentale suivie lors du criblage des molécules. CE50 : concentration pour laquelle la molécule présente 50 % d'effet.

### III.2.1.3. Résultats et discussion

Les principaux résultats peuvent se résumer ainsi :

- Parmi les 43 substances testées, 12 se caractérisent par leur capacité à inhiber les activités aromatasiques cérébrales et gonadiques chez la truite à une concentration de 10 µM. La majorité des substances inhibitrices sont des fongicides à usage agricole ou pharmaceutique (cf Tableau II de l'article 2). Aucune molécule n'a été capable d'induire les activités aromatasiques.

- L'efficacité d'inhibition des molécules est généralement faible comparée aux inhibiteurs stéroïdiens : ATD et 4-hydroxyandrosténédione (cf Tableau III de l'article 2). Toutefois, le clotrimazole, un fongicide de la classe des imidazoles, inhibe les activités aromatasiques à des concentrations qui sont proches de celles des inhibiteurs stéroïdiens.

- Les CI50 calculées révèlent également une différence de sensibilité entre le cerveau et l'ovaire. Parmi les molécules inhibitrices, 6 sont plus actives sur les ovaires, 4 agissent avec la même intensité sur les deux tissus et 2 sont plus actives sur le cerveau. Les raisons de cette différence de sensibilité ne sont pas connues à l'heure actuelle.

- Le test de dosage des activités aromatasiques dans les microsomes permet de mettre en évidence des molécules capables d'inhiber les activités enzymatiques. Cependant, ce test ne permet de détecter que les molécules ayant un effet direct sur le complexe enzymatique P450aromatase. Toutes les molécules agissant au niveau transcriptionnel, traductionnel et/ou post-traductionnel n'auront aucun effet dans le système microsomes. C'est une des raisons

pour lesquelles des travaux complémentaires ont été réalisés au laboratoire sur des cellules JEG-3 (cellules de choriocarcinome placentaire humain)<sup>2</sup>. Les résultats sont présentés dans l'article 5. Parmi les 26 molécules qui ont été testées dans les deux systèmes *in vitro*, l'ensemble des inhibiteurs des activités aromatasases en microsomes est également capable d'inhiber les activités aromatasases dans les cellules JEG-3. Onze molécules sont sans effet dans les deux systèmes. En revanche, 11 substances ne présentant aucun effet en microsomes se sont avérées avoir un effet en JEG-3. Dix molécules induisent les activités aromatasases (e.g., atrazine, oxadiazon, metolachlor) et une molécule les inhibe (heptachlor), indiquant des effets en amont du complexe enzymatique.

#### III.2.1.4. Conclusions

Les P450 aromatasases cérébrales et gonadiques sont des cibles moléculaires d'un certain nombre de xénobiotiques. A l'exception du méthylmercure, les molécules inhibant les activités aromatasases sont essentiellement des fongicides imidazoles ou des molécules ayant des structures chimiques similaires. Certaines de ces substances sont présentes dans le milieu aquatique à des concentrations qui sont actives *in vitro* et pourraient donc participer aux effets observés sur les populations *in situ*. Cependant les effets *in vivo* de ces molécules sur les activités aromatasases ne sont pas renseignés pour la plupart d'entre elles. C'est la raison pour laquelle, des expérimentations *in vivo* ont été menées.

### III.2.2 Perturbation des aromatasases par le clotrimazole (article 3)

#### III.2.2.1. Objectif

Parmi les molécules testées *in vitro* sur microsomes de truite, le clotrimazole s'est avéré être la molécule la plus inhibitrice des activités aromatasases après les inhibiteurs stéroïdiens. Par ailleurs, l'occurrence environnementale de cette molécule est renseignée (Thomas and Hilton, 2004; Roberts and Thomas, 2006). Le but de ce travail a consisté à étudier les effets *in vivo* du clotrimazole sur l'expression des aromatasases dans le cerveau et les gonades de poisson zèbre.

---

<sup>2</sup> L'étude des effets de pesticides sur les activités aromatasases dans les cellules JEG-3 a été réalisée dans le cadre d'une thèse menée au laboratoire (thèse de Nathalie Laville).

### III.2.2.2. Démarche expérimentale

Les protocoles expérimentaux sont donnés en détail dans l'article 3, et la démarche expérimentale suivie pour les expositions au clotrimazole est schématisée dans la figure 26.

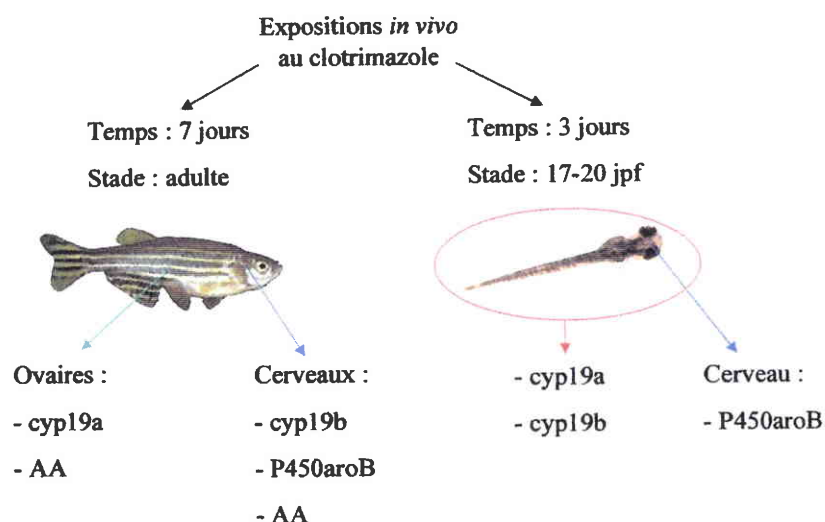


Figure 26 : Schéma de la démarche expérimentale suivie lors des expositions au clotrimazole. cyp19a, cyp19b : mesure de l'expression des gènes cyp19a et cyp19b ; P450aroB : mesure de la synthèse de la protéine aromatasase B ; AA : mesure des activités aromatasases ; jpf : jours post-fertilisation.

### III.2.2.3. Résultats et discussion

#### - Effet *in vivo* du clotrimazole sur les aromatasases chez le poisson zèbre

Dans l'ovaire, le clotrimazole induit l'expression du gène cyp19a quelque soit la concentration testée mais l'effet est indépendant de la dose (induction d'un facteur 3). Au niveau enzymatique, les activités aromatasases sont induites seulement aux faibles concentrations et inhibées à la plus forte concentration. Dans le cerveau, l'expression du gène cyp19b, la synthèse de la protéine aromatasase B ainsi que les activités aromatasases sont induites aux faibles concentrations alors qu'aux fortes concentrations, elles sont inhibées.

Le clotrimazole est donc capable d'une part, d'induire les activités transcriptionnelles des gènes *cyp19a* et *cyp19b* dans les ovaires et le cerveau respectivement, et d'autre part d'agir directement sur les complexes enzymatiques en les inhibant.

Connaissant les propriétés inhibitrices du clotrimazole *in vitro*, les inductions observées aux niveaux des gènes, protéines et activités enzymatiques sont surprenantes. Au niveau gonadique, des profils d'expressions similaires du gène *cyp19a* et de l'activité aromatasase dans les ovaires ont été mesurés chez le vairon à tête de boule après une exposition de 7 jours au fadrozole (Villeneuve *et al.*, 2006). Les mécanismes sous-jacents permettant d'expliquer l'induction de l'expression du gène *cyp19a* ne sont toutefois pas connus. En ce qui concerne, l'induction du gène *cyp19b*, l'exposition de larves de poissons zèbres confirme la capacité du clotrimazole à induire l'expression du gène *cyp19b*. Cependant, cette induction significative est faible et au niveau immunohistochimique, aucune induction de la protéine *aroB* n'est observée montrant le caractère faiblement inducteur de cette molécule. Dans le cerveau, nous avons montré que l'E2 était capable d'induire au niveau transcriptionnel et traductionnel l'expression de l'aromatase cérébrale par un mécanisme ER-dépendant. Nous nous sommes donc interrogés sur les propriétés œstrogéniques du clotrimazole.

### **- Induction du gène *cyp19b* : mécanisme d'action ?**

L'œstrogénicité du clotrimazole a été testée dans deux modèles cellulaires différents :

- les cellules MELN qui sont des cellules cancéreuses de sein (MCF-7) transfectées avec le gène de la luciférase sous le contrôle d'un promoteur ERE,
- les cellules U251-MG qui sont des cellules gliales humaines exprimant la luciférase sous contrôle du promoteur du gène *cyp19b* de poisson zèbre.

Des résultats contradictoires ont été obtenus. Dans la lignée cellulaire MELN, le clotrimazole induit la transcription du gène de la luciférase de façon dose-dépendante. En revanche, dans les cellules gliales aucune induction de l'activité luciférase par le clotrimazole n'est mise en évidence. L'œstrogénicité du clotrimazole dépend donc du contexte cellulaire.

Une première hypothèse possible pour expliquer cette différence pourrait être liée à la capacité du clotrimazole à activer les AhR (Navas *et al.*, 2004). Alors que les cellules gliales sont dépourvues de AhR, le clotrimazole induit l'activité AhR-dépendante du P4501A dans les cellules MELN (figure 6 de l'article 3). Dans ces cellules MELN, les complexes AhR



activés par le fongicide seraient alors capables de recruter les ERs permettant la transcription ERE-dépendante de la luciférase selon un mécanisme d'interaction entre les ERs et AhR décrit par (Ohtake *et al.*, 2003) dans les MCF-7. Est-ce que ce type d'interaction ER-AhR est susceptible de rendre compte de l'induction du gène *cyp19b* *in vivo* ? Des résultats récents ont montrés qu'un agoniste connu des AhR, la TCDD, n'était pas capable d'induire l'expression du gène *cyp19b* et de la protéine *aroB* chez les larves de poissons zèbres (Cheshenko *et al.*, soumis). Il est donc peut probable que le clotrimazole induise l'aromatase B par ce type d'interaction.

Une seconde hypothèse concerne la métabolisation du clotrimazole en métabolites œstrogéniques. Chez les humains et les rats, le clotrimazole est métabolisé en divers composés, dont la benzophénone (Duhm *et al.*, 1974) qui possède une faible activité œstrogénique *in vitro* dans les cellules MCF-7 (Suzuki *et al.*, 2005). Il s'agirait de déterminer si ce métabolite (ou d'autres métabolites aux propriétés œstrogéniques) est formé dans les cellules MELN ainsi que chez les poissons zèbres.

#### III.2.2.4. Conclusions

Le clotrimazole qui est connu pour inhiber *in vitro* les P450 aromatasés dans le cerveau et les ovaires de truite (Monod *et al.*, 1993, article 2), inhibe également les activités aromatasés cérébrales et gonadiques chez le poisson zèbre. Cependant, cette molécule présente des effets *in vivo* plus complexes qu'initialement envisagé puisqu'elle induit également les activités aromatasés aux faibles concentrations. Les mécanismes d'induction n'ont toutefois pas pu être élucidés dans cette étude. De manière plus générale, les imidazoles possèdent des mécanismes d'actions complexes et variés. Par exemple, il a été montré qu'*in vitro* ils pouvaient entraîner des effets similaires aux gonadotropines et induire la maturation ovocytaire chez la truite (Monod *et al.*, 2004).

Ces expérimentations renforcent l'intérêt d'étudier les effets des molécules aux différents niveaux d'expression des aromatasés (gène, protéine, activité enzymatique) dans les deux tissus (cerveau et gonade), les effets observés étant différents.

### *III.2.3 Perturbation des aromatasés par deux xéno-œstrogènes environnementaux : le nonylphénol et l'éthinyl-œstradiol (article 4)*

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés aux effets des xéno-œstrogènes, substances connues pour être présentes dans l'environnement aquatique, sur les aromatasés chez le poisson.

#### III.2.3.1. Objectif

Les résultats obtenus avec l'E2 montrent que cette molécule est capable d'induire l'expression du gène *cyp19b* dans le cerveau des poissons zèbres au stade adulte et au stade larvaire, et d'inhiber l'expression du gène *cyp19a* et les activités aromatasés dans les ovaires au stade adulte. Au vue de ces résultats, nous avons décidé de tester les effets de deux xéno-œstrogènes dont l'occurrence environnementale est démontrée, le nonylphénol (NP) et l'éthinyl-œstradiol (EE2), sur l'expression des aromatasés, afin de déterminer si les effets observés avec des molécules œstrogène-mimétiques sont les mêmes qu'avec l'E2. Ces résultats sont présentés dans l'article 4 qui présente aussi les effets des (xéno)-œstrogènes sur l'expression testiculaire du gène *cyp17*. Les résultats concernant le gène *cyp17* n'étant pas l'objet de ce travail de thèse, ils ne seront pas évoqués dans la partie Résultats.

#### III.2.3.2. Démarche expérimentale

Les protocoles expérimentaux sont donnés en détail dans l'article 4, et la démarche expérimentale suivie pour les expositions aux xéno-œstrogènes est schématisée dans la figure 27.

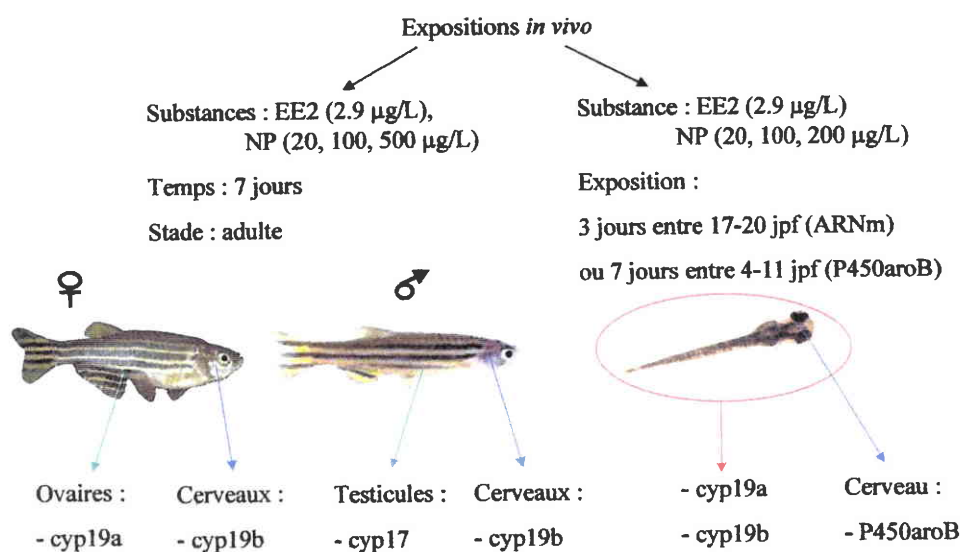


Figure 27 : Schéma de la démarche expérimentale suivie lors des expositions au nonylphénol (NP) et à l'éthinyl-oestradiol (EE2). cyp19a, cyp19b, cyp17 : mesure de l'expression des gènes cyp19a, cyp19b et cyp17 ; P450aroB : mesure de la synthèse de la protéine aromatasase B ; jpf : jours post-fertilisation.

### III.2.3.3. Résultats et discussion

Dans le cerveau, l'EE2 et le NP induisent l'expression du gène cyp19b chez les mâles (facteur d'environ 2.5). Les inductions observées chez les mâles exposés au NP sont dose-dépendantes et comparables à celles mesurées chez les mâles exposés à l'E2 10 nM. Toutefois, les concentrations en NP nécessaires pour induire l'expression du gène cyp19b sont environ 160 fois plus importantes que l'E2 ou l'EE2 montrant le caractère faiblement œstrogénique du NP. Chez les femelles, aucune induction du gène cyp19b n'est observée et confirme qu'au stade adulte, l'induction de l'aromatase B dans le cerveau est plus sensible chez les mâles, différence qui pourrait résulter des concentrations d'œstrogènes plus importantes dans le cerveau des femelles que des mâles.

Chez les femelles, l'exposition à l'EE2 ou au NP inhibe l'expression du gène cyp19a dans les ovaires. Pour le NP, l'inhibition n'est pas dose-dépendante et n'est observée que pour la plus forte concentration d'exposition (500µg/L). Bien que cette inhibition ne soit pas statistiquement significative ( $p = 0.052$ , test de Mann-Whitney), le taux d'inhibition est comparable à celui observé avec l'EE2. Ces résultats confirment ainsi l'impact négatif des (xéno)- œstrogènes sur l'expression du gène cyp19a dans les ovaires (article 1, Alberti *et al.*,

2005). Les inhibitions de l'expression du gène *cyp19a* conduisent probablement à une inhibition des activités aromatasés comme observé avec l'E2 (article 1) mais cette hypothèse mériterait d'être vérifiée.

Aux stades larvaires, l'expression du gène *cyp19a* n'est pas altérée par l'exposition à l'EE2 ou au NP quelque soit la dose. Ces résultats confirment que c'est au stade adulte que l'expression du gène *cyp19a* est la plus sensible aux effets des xéno-œstrogènes. Au contraire, chez les larves, l'EE2 et le NP induisent l'expression du gène *cyp19b* ainsi que de la protéine aromatasé B dans les cellules gliales radiales. Aux stades larvaires, les concentrations nécessaires à l'induction du gène *cyp19b* par le NP sont plus faibles qu'aux stades adultes (i.e., 20 µg/L pour le stade larvaire et 100 µg/L pour les mâles) ou pour l'EE2, les taux d'induction sont environ 6 fois plus importants que chez les adultes mâles. Ceci confirme la plus grande sensibilité de l'induction du gène *cyp19b* au stade larvaire comparativement au stade adulte vis-à-vis des (xéno)-œstrogènes. Pour aller plus loin sur l'étude de l'induction de l'aromatasé B chez les larves, des expérimentations complémentaires ont été réalisées avec deux autres alkylphénols (4-tert-pentylphénol et 4-tert-octylphénol) ainsi qu'avec le bisphénol A. Les résultats montrent que ces 3 xéno-œstrogènes induisent l'expression du gène *cyp19b* et que cette induction est ER-dépendante (Figure 28). L'ensemble de ces résultats renforce l'idée que l'induction du gène *cyp19b* est un marqueur biologique d'exposition sensible aux composés œstrogéniques.

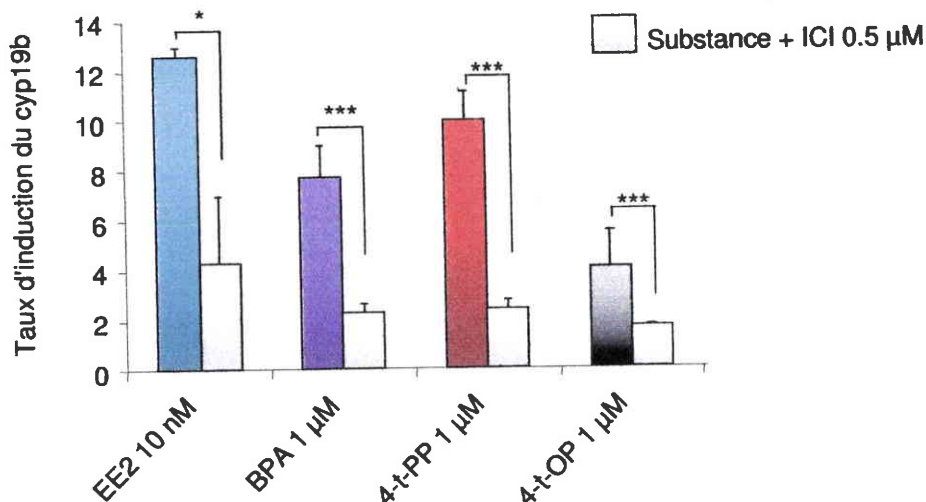


Figure 28 : Effet de xéno-œstrogènes seuls ou en coexposition avec de l'ICI 182-780 (antagoniste pur du récepteur des œstrogènes) sur l'expression du gène cyp19b chez les larves de poissons zèbres de 17 jpf exposées pendant 72 h. L'expression relative du gène d'intérêt est normalisée par l'expression relative du gène de la beta-actine. Les résultats sont présentés sous forme de taux d'induction par rapport au témoin DMSO. Les astérisques indiquent une différence significative entre les témoins et les exposés (test t de Student, \*  $p < 0.05$  ; \*\*\*  $p < 0.01$ ). EE2 : éthinyl-œstradiol, BPA :bisphéno A, 4-t-PP :4-t-pentylphéno, 4-t-OP :4-t-octylphéno.

#### III.2.3.4. Conclusions

L'ensemble des résultats obtenus montre que les xéno-œstrogènes sont capables de perturber l'expression des aromatasés dans les cerveaux et les gonades. Les effets observés sont similaires à l'E2 et sont dépendants du tissu cible, du sexe et du stade de développement.

Chez les femelles adultes, c'est l'inhibition du gène cyp19a dans les ovaires qui est la plus sensible et pourrait constituer un marqueur biologique potentiel d'une exposition à des composés œstrogéniques.

Chez les larves, c'est l'induction de l'aromatase B dans le système nerveux central qui est la plus sensible et permet de déterminer de façon relativement rapide le caractère perturbateur endocrinien des substances chimiques capables d'interagir en tant qu'agonistes des ERs.



## DISCUSSION GENERALE

Le travail de cette thèse s'inscrit dans une démarche globale de développement de marqueurs biologiques de la perturbation endocrinienne chez le poisson et dans ce cadre nos travaux visaient à déterminer la pertinence de la mesure de l'expression des aromatasés chez le poisson comme marqueur biologique d'une contamination par des perturbateurs endocriniens. Les travaux se sont orientés autour de plusieurs axes complémentaires qui visaient à répondre aux questions suivantes :

- Quelles sont les méthodologies à mettre en œuvre pour mesurer l'expression des aromatasés ?
- Quels sont les niveaux d'expression de la variable biologique « P450 aromatasé » chez les poissons non contaminés ?
- Existe-t-il des facteurs biologiques ou abiotiques susceptibles de faire varier ces expressions en dehors de toute contamination ?
- Quelles substances sont capables de perturber les P450 aromatasés ?
- Quels sont les effets de ces substances sur les expressions des aromatasés ?

Ce chapitre a pour objectif de replacer les résultats présentés et discutés dans le chapitre Résultats, dans la problématique générale de cette thèse et de discuter la démarche méthodologique et les résultats, en soulignant les points qui mériteraient d'être approfondis.

### I. METHODES DE MESURES DES P450 AROMATASES CHEZ LE POISSON

Les données relatives aux aromatasés chez le poisson se limitent pour la majorité des études soit à l'analyse de l'expression des différentes isoformes des aromatasés, soit aux mesures des activités enzymatiques dans les tissus cibles. A l'initiation de ce travail, les informations concernant l'expression protéique des aromatasés se limitaient à l'isoforme B chez deux espèces de poissons uniquement, avec une absence de donnée chez le poisson zèbre. Il en résulte donc un manque d'information concernant les régulations transcriptionnelles, traductionnelles et post-traductionnelles des aromatasés qui amène à formuler la question suivante : la mesure de l'expression des gènes de l'aromatasé (ou des protéines) au sein d'un tissu cible reflète-t-elle les activités d'aromatase au sein de ce même tissu et inversement ? Il s'agissait en d'autre terme de s'interroger sur la pertinence de chacune des méthodes de

mesures à mettre en œuvre dans le contexte de notre étude. Par ailleurs, les méthodes doivent répondre à un certain nombre d'exigence et en particulier elles doivent permettre une mesure la plus sensible et la plus « simple » possible de l'aromatase au sein des tissus cibles chez un même individu.

Dans le cadre de cette thèse, les efforts expérimentaux visant à développer et valider des méthodes de mesures de l'expression des P450 aromatasés chez le poisson ont été très conséquents. Le tableau XII résume les avantages et les limites des différentes méthodes qui ont été développées. Ces résultats obtenus constituent en soit une originalité du travail puisqu'ils permettent d'étudier, au moins chez le poisson zèbre, l'expression des P450 aromatasés à différents niveaux sub-cellulaires, i.e. gènes cyp19a et cyp19b, protéine AroB et activités enzymatiques. De plus, il est important de souligner que l'expérimentateur est confronté à des contraintes inhérentes aux modèles biologiques et aux méthodologies employées. Par exemple, chez les espèces de petite taille comme le poisson zèbre, seules les mesures d'expression protéique et d'activités enzymatiques peuvent être combinées dans un même tissu d'un même individu.

Tableau XII : Avantages et inconvénients des méthodes de dosages des expressions / activités aromatasés utilisées dans cette étude.

	ARNm cyp 19a et cyp 19b (ADN branché)	Protéine AroB (Anticorps)	Activité enzymatique (Eau tritiée)
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> <li>- nécessité de faibles quantités de matériel biologique</li> <li>- mise en œuvre rapide</li> <li>- permet de distinguer les isoformes a et b du gène cyp19</li> <li>- mesure dans les tissus cibles (cerveau et gonades)</li> <li>- mesures individuelles (chez l'adulte)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- mesure spécifique de l'AroB</li> <li>- mesure dans le tissu cible (cerveau)</li> <li>- mesures individuelles (chez l'adulte)</li> <li>- utilisation à tous les stades de développement du poisson</li> <li>- localisation cellulaire</li> <li>- mesure rapide (ELISA)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- réactif biologique non spécifique d'une espèce donnée</li> <li>- facile à adapter à toute espèce</li> <li>- méthode sensible permettant des mesures individuelles (chez l'adulte) dans les tissus cibles</li> </ul>
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> <li>- nécessité de connaître la séquence nucléotidique des gènes</li> <li>- manque de sensibilité pour l'étude des stades larvaires</li> <li>- méthode spécifique d'une espèce donnée</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- nécessité de connaître la séquence polypeptidique</li> <li>- synthèse d'anticorps spécifique pas toujours aisée</li> <li>- marquages immunohistochimiques relativement lourds à mettre en œuvre</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- méthode radioactive (besoin d'autorisation)</li> <li>- nécessite des quantités de matériel plus importantes</li> <li>- pas de distinction entre les isoformes A et B de l'aromatase.</li> </ul>



Pour autant, les efforts méthodologiques mériteraient d'être poursuivis. En particulier, si la méthode utilisée pour mesurer l'expression des gènes *cyp19* s'avère efficace pour caractériser l'expression relative des isoformes de l'aromatase dans le cerveau et les gonades chez les adultes, elle n'est pas suffisamment sensible pour évaluer l'expression de ces gènes chez la larve de poisson zèbre. Il s'agirait alors de développer des méthodes RT-PCR permettant une expression quantitative et individuelle des gènes de l'aromatase aux stades précoces de développement (Fenske and Segner, 2004; Kazeto *et al.*, 2004; Sawyer *et al.*, 2006). Ces efforts concernent aussi l'obtention d'anticorps spécifiques pour chaque isoforme de l'aromatase. Si notre stratégie (i.e., développement d'anticorps à partir d'une séquence polypeptidique spécifique) s'est avérée efficace pour obtenir un anticorps anti-P450aroB de poisson zèbre, elle ne l'a pas été pour l'aromatase A. A ce jour différents anticorps anti-P450aromatase B ont été développés chez la truite (Forlano *et al.*, 2001) et le poisson zèbre (Menuet *et al.*, 2005; Kallivretaki *et al.*, 2006) et à notre connaissance aucun n'est disponible pour l'aroA. Il s'agirait alors d'envisager d'autres alternatives comme par exemple utiliser une protéine aroA recombinante purifiée comme antigène. Le développement d'anticorps apparaît comme particulièrement pertinent au regard des résultats obtenus à l'aide de l'anticorps anti-P450aroB. Les données acquises en immunohistochimie à l'aide de cet anticorps ont permis d'acquérir des données essentielles concernant la caractérisation de l'expression de la protéine aromatase B dans le cerveau et d'identifier les cellules exprimant l'aromatase dans le système nerveux central des poissons zèbres (i.e., cellules gliales radiaires). De plus, les mesures d'expression de la protéine aroB en immunohistochimie et par méthode ELISA se sont avérées particulièrement bien adaptées à l'étude des effets des substances chimiques dans le cerveau des larves (article 3 et 4) et des adultes (article 1 et 3). Le développement d'un anticorps anti-P450aroA permettrait d'acquérir des données essentielles concernant l'expression tissu ou cellule-spécifique de l'aromatase A dans les gonades de poisson zèbre et viendrait compléter les informations relatives à l'expression gonadique de ce gène chez le poisson zèbre (Rodriguez-Mari *et al.*, 2005). Une telle approche consistant à étudier l'expression génique et protéique d'enzymes de la stéroïdogénèse dans les ovaires et testicules a récemment été menée chez l'anguille japonaise et met en évidence des différences à la fois dans la distribution tissulaire et dans les niveaux d'expression des ARNm et protéine P450 11A (Ijiri *et al.*, 2006) accentuant la nécessité d'étudier l'expression des enzymes de la stéroïdogénèse à différents niveaux sub-cellulaires.

## II. CARACTERISATION DES EXPRESSIONS DES AROMATASES CHEZ LE POISSON ZEBRE

Au cours de cette étude, une part importante du travail a porté sur la caractérisation de la variable aromatase chez le poisson à l'aide des différentes méthodes développées. Outre le fait que des données originales sur la caractérisation biochimique et moléculaire ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $PM$ , identification de types cellulaires) des aromatases aient été acquises, cette caractérisation de la variable aromatase a été réalisée en déterminant les niveaux d'expression et d'activité chez des poissons non exposés tout en tenant compte de facteurs biologiques tels que le tissu, le sexe, la maturité sexuelle ou encore le stade de développement. Cette connaissance des niveaux de base de l'expression des aromatases et des facteurs naturels susceptibles de les faire varier est un préalable indispensable dans une démarche de validation de l'aromatase comme marqueur d'une perturbation endocrinienne.

### II.1. Influence de facteurs biologiques sur les aromatases

Nos travaux montrent que l'aromatase s'exprime dans le cerveau des mâles et des femelles ainsi qu'au niveau gonadique. Alors que le sexe n'affecte pas la distribution et les niveaux d'expression des isoformes de l'aromatase dans le cerveau ( $cyp19b \gg cyp19a$  chez les mâles et les femelles), les mesures d'expression de la protéine *aroB* et des activités enzymatiques montrent l'existence d'un dimorphisme sexuel, les expressions protéiques et activités enzymatiques étant plus importantes chez les femelles que chez les mâles. Au niveau gonadique, cette influence du sexe se retrouve tant sur la distribution des expressions des deux isoformes ( $cyp19a > cyp19b$  dans les ovaires, et  $cyp19a < cyp19b$  dans les testicules) que sur les activités enzymatiques puisque quelque soit l'espèce étudiée, aucune activité aromatase n'a été trouvée dans les testicules alors que ces activités sont présentes dans les ovaires.

Ces expressions aromatases ne dépendent pas uniquement du sexe mais également de l'âge et du statut reproducteur (Blazquez and Piferrer, 2004). A cet égard, les données concernant les activités aromatases chez la truite montrent que l'état de maturité des femelles (mesuré par le GSI) influence à la fois les activités aromatases neuronales et gonadiques, les profils d'expression étant par ailleurs distincts selon le tissu (article 2). De telles variations d'activités aromatases dans le cerveau et durant le développement ovocytaire ont été décrites chez de nombreuses espèces présentant un cycle de reproduction annuel (Pasmanik and

Callard, 1988; Trant *et al.*, 1997; Gelinas *et al.*, 1998; Sampath Kumar *et al.*, 2000; Gen *et al.*, 2001). La mise en évidence de telles variations chez des espèces asynchrones et à cycle court telles que le poisson zèbre ou le vairon à tête de boule, sont beaucoup plus difficiles à mettre en évidence.

A cet égard, des corrélations entre expression des gènes de l'aromatase et GSI ont pu être mises en évidence chez le poisson zèbre, mais ces corrélations restent faibles et soulignent les limites de notre approche. Chez le poisson zèbre, les ovaires des femelles peuvent contenir en même temps jusqu'à quatre stades distincts de follicules : les follicules primaires, les follicules pré-vitellogéniques, les follicules vitellogéniques, et les follicules matures (Ings and Van Der Kraak, 2006). Il s'agirait donc d'étudier l'expression des gènes dans chaque type de follicule séparément et non dans la gonade entière comme nous l'avons fait. En ayant ce type d'approche, il a été démontré que l'expression du gène *cyp19a* ainsi que d'autres enzymes de la stéroïdogénèse, variait en fonction du stade de développement des follicules, l'aroA augmentant durant la phase pré-vitellogénique et étant inhibée durant la phase de maturation (Goto-Kazeto *et al.*, 2004; Ings and Van Der Kraak, 2006).

L'ensemble de ces données montre que chez le poisson zèbre, la maturité sexuelle influence les expressions et activités aromatasés dans le cerveau et les gonades. La synthèse d'œstradiol semble être régulée au niveau de la transcription des gènes *cyp19*, mais des mécanismes de régulation post-transcriptionnelle ou post-traductionnelle ne sont pas à exclure. En effet, la stabilisation des ARNm de gènes impliqués dans la reproduction constitue un mécanisme important de la régulation hormonale (Ing, 2005). Chez les oiseaux, il a aussi été montré que les aromatasés pouvaient être régulées par des mécanismes post-traductionnels faisant intervenir la voie de phosphorylation des aromatasés (Balthazart *et al.*, 2001). La phosphorylation du complexe protéique de l'aromatase permet une régulation (inhibition) rapide de l'activité enzymatique. Il reste cependant à déterminer si ce type de mécanisme existe chez les poissons, et dans quelle mesure il peut être, en partie, responsable des variations observées chez le poisson zèbre.

## II.2. Influence de facteurs abiotiques sur les aromatasés

Par ailleurs, il convient de souligner que des facteurs externes sont capables de modifier l'expression des aromatasés, comme par exemple la température. Il existe en effet de nombreuses études qui montrent que les fortes températures inhibent l'expression ovarienne

de l'aromatase *in vivo* et *in vitro* (Watts *et al.*, 2004). Il est intéressant d'observer que la température influence aussi les activités catalytiques des aromatasés chez la truite (article 2) et la loup de mer (Gonzalez and Piferrer, 2002). Cependant, il est peu probable que ce facteur puisse expliquer les fortes variations d'expressions observées chez le poisson zèbre, ce paramètre étant contrôlé au laboratoire. De façon plus plausible, on pourra évoquer le facteur nourriture. Celle-ci contient des flavonoïdes et isoflavonoïdes (Inudo *et al.*, 2004; Matsumoto *et al.*, 2004), dont certains sont connus pour moduler l'expression des aromatasés : inhibition *in vitro* des activités d'aromatation dans les cellules de la granulosa humaine (Rice *et al.*, 2006) ou dans les microsomes d'ovaires de truite (Pelissero *et al.*, 1996), induction de l'aromatase cérébrale *in vitro* et *in vivo* chez le poisson zèbre (Le Page *et al.*, 2006). La démonstration d'une influence de la nourriture sur les expressions des aromatasés chez le poisson zèbre reste cependant à faire.

Quoiqu'il en soit l'ensemble de ces données montre que des facteurs biologiques (tissu, sexe, âge, maturité sexuelle) et des facteurs externes (température) sont susceptibles de faire varier l'aromatase en dehors de toute contamination. Si certains de ces paramètres peuvent être contrôlés lors d'expérimentations au laboratoire, il n'en est pas de même lors d'expérimentations *in situ*. Dans ce contexte, on préconisera la prise en compte de ces facteurs biotiques et abiotiques pour une interprétation optimale de la mesure des aromatasés (Hecker *et al.* In press b, ; Martin-Skilton *et al.*, 2006).

### III. PERTURBATIONS DES EXPRESSIONS AROMATASES CEREBRALES ET GONADIQUES

Dans le cadre de notre étude, les effets de diverses substances ont été étudiées *in vitro* sur microsomes de cerveaux et d'ovaires de truite et *in vivo* chez le poisson zèbre. Globalement, les données obtenues montrent que les cytochromes P450 aromatasés dans le cerveau et les gonades sont des cibles moléculaires et biochimiques des xénobiotiques. Si *in vitro*, seuls des effets inhibiteurs ont été observés, les perturbations mesurées *in vivo* (inductions, inhibitions) sont différentes selon le tissu cible considéré (cerveau, gonades) et nettement influencées par le stade de développement de l'organisme. Par ailleurs, nous montrons que les molécules sont capables de perturber les aromatasés en modifiant la transcription des gènes et/ou en agissant directement sur le complexe enzymatique selon des mécanismes qui sont encore mal compris pour certains. Néanmoins ces travaux permettent d'apporter des réponses pertinentes quant à

l'utilisation des aromatasés comme marqueurs biologiques d'une perturbation endocrinienne chez le poisson.

### III.1. Le gène *cyp19b* : biomarqueur candidat des xéno-œstrogènes

Dans le cerveau des poissons, l'œstradiol régule sa propre synthèse par une boucle d'auto-régulation positive en stimulant la synthèse d'aromatase B (Callard *et al.*, 2001). *In vivo*, nous montrons que l'exposition de poisson zèbres à des molécules œstrogéniques ayant des affinités variables vis-à-vis des récepteurs des œstrogènes (affinités fortes pour E2 et EE2, affinité faible pour NP) induit l'activité transcriptionnelle du gène *cyp19b* (article 4, (Kishida *et al.*, 2001; Menuet *et al.*, 2005; Meucci and Arukwe, 2006). Cette synthèse *de novo* d'ARNm se traduit par une synthèse *de novo* de la P450aroB dans les cellules gliales radiaires (article 4, Menuet *et al.*, 2005) montrant que les molécules agissent au niveau transcriptionnel et traductionnel. En co-exposant les organismes à de l'ICI 182-780, nos résultats confirment que les inductions du *cyp19b* requièrent des récepteurs des œstrogènes fonctionnels (article 4, (Menuet *et al.*, 2005). L'induction de l'aromatase B est plus sensible chez les larves que chez les adultes. Cette plus grande sensibilité se manifeste par des taux d'induction plus importants ou par des concentrations efficaces plus faibles lorsque les poissons sont exposés au stade larvaire comparativement aux adultes. L'inductibilité de l'aroB est rapide puisqu'elle est observée dès trois jours d'exposition et les taux d'inductions mesurés sont importants (>16 fois les valeurs d'expression des témoins avec l'E2) et comparables à ceux mesurés par RT-PCR chez les larves de poissons zèbres exposées dans des conditions similaires à de l'E2 ou EE2 (Le Page et Pakdel, communication personnelle) mais cependant, plus faibles que ceux mis en évidence par Kazeto *et al.* (2004) et Meucci *et al.* (2006), les différences résidant probablement dans les méthodes employées. La mesure d'une inductibilité forte et rapide de l'aroB chez la larve a été mise à profit pour évaluer l'œstrogénicité de substances chimiques (BPA, 4-t-PP, 4-t-OP). L'ensemble de ces résultats démontre que la mesure de l'induction du *cyp19b* aux stades larvaires constitue donc un excellent biomarqueur candidat des xéno-œstrogènes (Kishida *et al.*, 2001; Kazeto *et al.*, 2004; Menuet *et al.*, 2005). Bien que l'induction soit plus sensible chez les larves, des inductions ont été également observées chez les adultes mais uniquement chez les mâles. Cette différence de sensibilité entre sexe est aussi observée chez une autre espèce, le vairon à tête de boule, exposé à de faibles concentrations

d'E2 (Halm *et al.*, 2002). Dans ce contexte, on préconisera l'utilisation de poissons sexuellement immatures (larves, juvéniles) pour évaluer le potentiel œstrogéniques des substances au laboratoire. Dans l'optique d'utiliser l'aromatase B comme marqueur biologique d'une exposition à des œstrogènes, il convient néanmoins de s'interroger sur la spécificité des réponses mesurées. En effet, dans la région promotrice du gène *cyp19b*, différents éléments de réponse ont été identifiés, même si seule la fonctionnalité des ERE a été démontrée (Menuet *et al.*, 2005). Parmi les éléments de réponse, un ARE putatif a été décrit. Chez le poisson zèbre, la 17-alpha-méthyltestostérone induit l'expression du gène *cyp19b*, mais il est très probable que l'induction soit liée à l'aromatation de cet androgène en œstrogène (Trant *et al.*, 2001). Chez le poisson chat, l'effet inducteur de la testostérone est inhibé en présence d'ATD suggérant aussi que l'effet observé est lié à l'aromatation de l'androgène (Kazeto and Trant, 2005). La région promotrice du gène *cyp19b* se caractérise aussi par la présence d'un AhRE, encore appelé DRE ou XRE. La question des effets des molécules agonistes du AhR sur l'expression du gène *cyp19b* (et plus généralement sur l'expression de gènes œstrogéno-régulés) fait actuellement l'objet de nombreux travaux. Kazeto *et al.* (2004) ont montré que le benzo[a]pyrène était capable d'induire l'expression de ce gène chez le poisson zèbre. Cependant, des données récentes montrent que la TCDD est sans effet sur l'expression génique et protéique de l'aroB (Cheshenko *et al.*, soumis). Il est très probable que les effets observés par Kazeto *et al.* (2004) soient liés à la métabolisation du benzo[a]pyrène en métabolites œstrogéniques (Charles *et al.*, 2000). Des travaux récents montrent au contraire que le benzo[a]pyrène et la TCDD étaient capables d'inhiber l'induction E2-dépendante du gène et de la protéine aroB chez le poisson zèbre et que ces inhibitions étaient indépendantes de la séquence AhRE mais impliquait très probablement le récepteur AhR (Cheshenko *et al.*, soumis). Ces résultats démontrent ainsi le caractère anti-œstrogénique de ces molécules (Safe *et al.*, 1998) et ouvre la perspective d'utiliser au moins au laboratoire la mesure de l'expression de l'aromatase B comme marqueur biologique de composés (anti)-œstrogéniques (Figure 29). Ces résultats soulèvent aussi la question de la réponse du biomarqueur induction aromatase dans le cas de mélanges complexes de polluants, mélanges qui sont plus représentatifs d'une contamination environnementale que ne l'est l'exposition d'un organisme à un seul polluant. Ce type d'expérimentation pourrait être envisagé si l'on souhaite utiliser la variable aromatase B dans le contexte d'études environnementales.

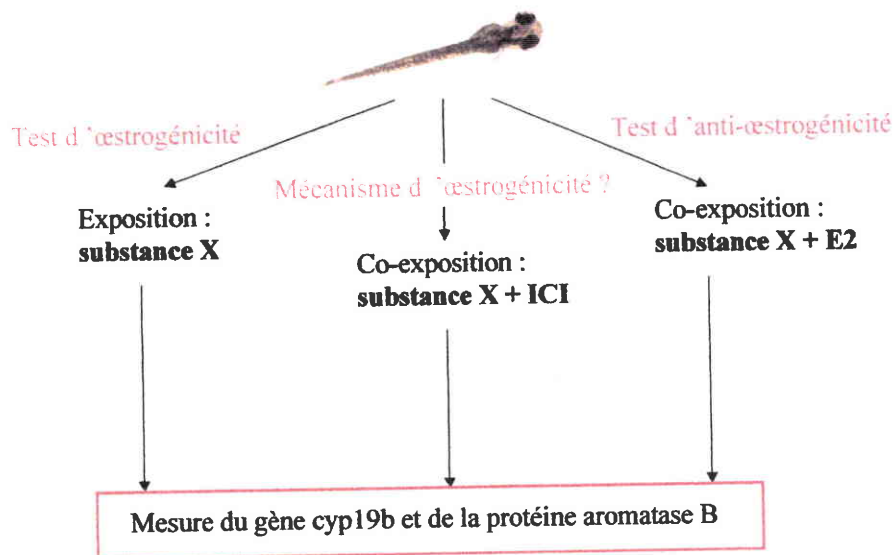


Figure 29 : Démarche à suivre pour tester le potentiel (anti)-œstrogénique de substances chimiques sur l'expression de l'aromatase B chez la larve de poisson zèbre.

### III.2. Inhibition des expressions et des activités enzymatiques des P450aromatases

Les effets des œstrogènes ne se limitent pas aux inductions d'aromatase dans le cerveau des poissons. En particulier, l'E2, l'EE2 et le NP sont capables d'inhiber la transcription du gène *cyp19a* dans les ovaires (article 4, Alberti *et al.*, 2005, Sawyer *et al.*, 2006). Nous montrons par ailleurs que ces inhibitions transcriptionnelles se traduisent par des inhibitions des activités aromatasés. Comme pour le cerveau, les réponses mesurées au niveau gonadique sont marquées et rapides (quelques jours) mais les effets des xéno-œstrogènes dans ces deux tissus sont clairement de natures différentes (au moins dans les conditions expérimentales retenues dans le cadre de ce travail). Cela démontre que les mesures des expressions des aromatasés dans le cerveau et les gonades dans le contexte d'étude sur les perturbateurs endocriniens constituent des marqueurs d'une perturbation endocrinienne qui sont complémentaires (induction / inhibition). La mesure d'une inhibition d'aromatase dans les gonades renseigne-t-elle d'une exposition à des mimétiques d'œstrogènes ? Les données obtenues avec l'ATD, un inhibiteur stéroïdien, montrent que de façon identique à l'E2, il inhibe les activités d'aromatase dans le cerveau mais aussi dans les gonades. Par conséquent, la seule mesure d'une inhibition d'aromatase dans les gonades ne signifie pas que

les poissons aient été exposés à des mimétiques d'œstrogènes. Les mécanismes sous-jacents sont cependant différents puisque l'E2 agit probablement au niveau transcriptionnel alors que l'ATD agit, au moins dans un premier temps, sur le complexe enzymatique sans modifier l'expression du gène *cyp19a*, renforçant la nécessité de mesurer les aromatasés à différents niveaux d'expression (i.e., gène, protéine, activité). A cet égard, les mesures de *cyp19a* ne renseignent pas nécessairement de l'effet observé au niveau de la protéine fonctionnelle (Villeneuve *et al.*, 2006, article 3). Ainsi, des inductions du gène *cyp19a* sont observées dans les ovaires de poissons exposés au fadrozole ou au clotrimazole, alors qu'au niveau enzymatique, les activités sont induites puis inhibées (Villeneuve *et al.*, 2006, article 3).

Concernant le clotrimazole, les effets *in vivo* mesurés dans notre étude ne pouvaient être prédits sur la base des données *in vitro*. A l'aide d'un test *in vitro* développé dans le cadre de cette thèse (article 2), nous avons montré que le clotrimazole ainsi que 10 autres pesticides de la famille des imidazoles et des pyrimides étaient capables d'inhiber de façon dose-dépendantes les activités aromatasés sur microsomes de cerveaux et de gonades de truite arc-en-ciel confirmant les données relatives aux effets inhibiteurs de cette famille de polluants chez les mammifères (Andersen *et al.*, 2002; Sanderson *et al.*, 2002; Laville *et al.*, 2006) et les poissons (Monod *et al.*, 1993; Noaksson *et al.*, 2003). Cependant, les effets *in vivo* mesurés sont beaucoup plus complexes et dépendent de la concentration d'exposition, du tissu cible mais aussi du niveau d'expression auquel les aromatasés sont mesurées. Cès données démontrent d'une part que l'extrapolation des données sur les interférences des xénobiotiques avec l'aromatase *in vitro* (et probablement les autres enzymes de la stéroïdogénèse) à une situation *in vivo* n'est pas aisée. Cette constatation révèle probablement les mécanismes d'actions multiples du clotrimazole sur différentes cibles moléculaires du système endocrinien (ER, AhR, article 3). Cette observation peut-être étendue à d'autres molécules. En effet, des travaux récemment menés au laboratoire à l'aide de modèles cellulaires humains et poissons montrent que certains pesticides, dont certains imidazoles, sont capables d'agir avec différentes cibles endocriniennes comme les ER, AR, aromatase, AhR et PXR (Aït-Aïssa *et al.*, 2006). L'ensemble de ces données motive (i) la conduite d'expérimentations sur organismes entiers pour évaluer les effets perturbateurs endocriniens des substances (ii) une meilleure connaissance des propriétés perturbatrices endocriniennes des substances chimiques et (iii) une meilleure connaissance des mécanismes de régulation de l'expression des aromatasés notamment dans la gonade. Néanmoins, les données fournies dans ce travail sont encourageantes et démontrent l'intérêt de notre démarche consistant à mesurer l'expression



des aromatasés à la fois dans le cerveau et les gonades au niveau des gènes, protéines et activités enzymatiques.

Cependant, si notre étude montre que les aromatasés sont perturbées par des substances chimiques, elle n'aborde pas la question des conséquences fonctionnelles de ces perturbations sur la physiologie et la reproduction des poissons.

#### **IV. CONSEQUENCES FONCTIONNELLES DES PERTURBATIONS DE LA SYNTHÈSE D'OESTROGENES**

L'aromatase est une variable sensible et précoce apte à fonder un diagnostic sur le potentiel perturbateur endocrinien des molécules. Toutefois, afin d'utiliser efficacement cette variable dans une démarche d'évaluation des risques, il est nécessaire de comprendre les conséquences des altérations induites à leur niveau en terme d'effets avérés sur les individus et les populations (Miracle and Ankley, 2005). Cette partie de discussion donne des pistes sur les conséquences fonctionnelles potentielles des molécules qui sont actuellement explorées. Toutefois, les effets potentiels cités dans ce paragraphe ne sont pas exhaustifs et présentent uniquement des grands axes de recherche.

##### **IV.1. Aromatase, vitellogénèse et gamétogénèse ?**

Chez le poisson femelle, les œstrogènes déclenchent la vitellogénèse, processus qui se déroule au niveau du foie et qui, après transfert des produits de synthèse (vitellogénine) aux gonades, conduit à la constitution des réserves de l'œuf. Les perturbations d'activités aromatasés observées dans notre étude chez les femelles exposées à l'E2 et l'ATD sont donc fortement suspectées d'induire des effets secondaires sur la synthèse de vitellogénine et par voie de conséquence sur la qualité des œufs. Ce type de démonstration a été en partie réalisé chez le vairon à tête de boule femelle, les inhibitions des activités aromatasés entraînant une réduction des concentrations en œstradiol circulant et en vitellogénine (Ankley *et al.*, 2002; Ankley *et al.*, 2005). Ces réponses sont accompagnées d'altérations marquées de l'histologie des ovaires et d'une baisse de fécondité des individus. De plus, il est intéressant de noter que de fortes concentrations d'exposition à de l'œstradiol entraînent une altération de l'ovogénèse, les ovaires des poissons femelles exposés étant principalement constitués d'ovocytes immatures (Brion *et al.*, 2000; Van den Belt *et al.*, 2004), ou caractérisés par la présence de

nombreux follicules atréiques et d'aucun ovocyte mature (Miles-Richardson *et al.*, 1999). Ces effets sur l'ovogenèse pourraient être médiés par une inhibition des expressions et activités aromatasés dans les ovaires. Chez les mâles, aucune activité d'aromatation n'a été mesurée et aucun effet de l'E2 et de l'ATD sur l'expression des gènes *cyp19* n'a été mis en évidence. Cependant, chez les mammifères, les œstrogènes sont indispensables à la spermatogenèse (Robertson *et al.*, 1999) et l'on peut penser qu'ils le soient aussi chez les poissons (Piferrer and Blázquez, 2005). Il est à noter que chez le poisson zèbre exposé au TBT (un inhibiteur d'aromatase) à des stades précoces de développement, les mâles présentent pour la plupart des testicules produisant une grande quantité de sperme sans flagelle, altérant ainsi leur fertilité (McAllister and Kime, 2003).

#### IV.2. Aromatase et différenciation sexuelle

Chez les poissons, la différenciation sexuelle est un processus beaucoup plus labile que chez les mammifères. Même chez les espèces possédant des chromosomes sexuels, la différenciation sexuelle est sensible aux facteurs environnementaux. L'aromatase est une enzyme clé dans le processus de différenciation sexuelle chez les poissons (cf paragraphe IV.5.3 de la SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE). Toutefois, l'implication exacte de chaque isoforme de l'aromatase dans ce processus n'est pas encore élucidée. Il serait intéressant de pouvoir inhiber spécifiquement chacune des isoformes de l'aromatase afin de déterminer leur rôle exact dans la différenciation sexuelle. Chez le poisson zèbre, une étude récente tend à montrer que ce serait l'inhibition de l'expression de l'aromatase A dans les gonades qui orienterait la différenciation de la gonade vers le testicule (Rodriguez-Mari *et al.*, 2005). Il serait donc intéressant de suivre en parallèle l'expression de la protéine aromatase A dans la gonade et le développement histologique de cette même gonade, afin d'étayer l'hypothèse de l'implication de l'aromatase A dans ce processus de différenciation sexuelle.

#### IV.3. Aromatase et effets neuroendocrines

Dans notre étude, des perturbations d'expressions et d'activités aromatasés ont été mesurées dans le cerveau et posent donc la question des effets neuroendocrines de ces molécules. A l'heure actuelle, les effets des perturbations de la synthèse des œstrogènes sur les organismes

restent encore mal connus, en particulier au niveau du cerveau. Etant donné le rôle supposé des neuro-œstrogènes dans la neurogenèse continue du cerveau des poissons téléostéens (Gelinas *et al.*, 1998; Forlano *et al.*, 2001; Pellegrini *et al.*, 2005; Pellegrini *et al.*, In press), une inhibition ou une induction de la synthèse de ces neuro-œstrogènes pourrait potentiellement perturber les processus de prolifération cellulaire, d'apoptose, de migration des cellules le long des cellules gliales radiaires, ainsi que de différenciation de ces cellules en neurones. La figure 30 résume les questions que l'on est amené à se poser sur l'impact d'une perturbation de la synthèse d'œstrogènes dans le cerveau.

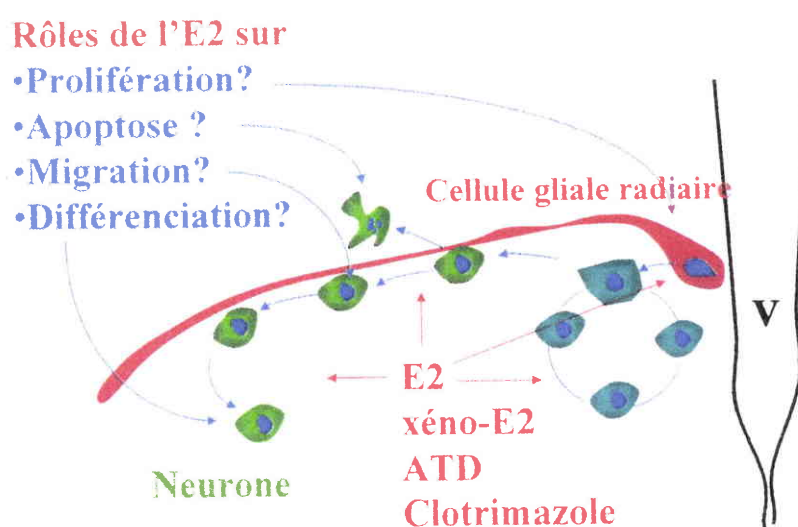


Figure 30 : Impact d'une perturbation de la synthèse d'œstrogènes sur le développement cérébral ? E2 : œstradiol, xéno-E2 : xéno-œstrogènes, ATD : androstatriènedione (D'après O. Kah, communication personnelle)

#### IV.4. Aromatase et axe Hypothalamus-Hypophyse-Gonades

La plupart des études s'intéressent à l'effet des substances sur la reproduction en étudiant les perturbations au niveau de la gonade, en revanche peu d'études s'intéressent aux effets de ces substances sur le cerveau, qui est un organe majeur pour la reproduction. En effet, un système important du cerveau qui est impliqué dans l'initiation et le maintien de la reproduction est le système des neurones à gonadolibérine (GnRH). La GnRH stimule la libération d'hormones qui sont capables de stimuler la stéroïdogénèse gonadique, la gamétogenèse ainsi que l'ovulation et la libération du sperme (Singh *et al.*, 1988; Peter *et al.*, 1991; Kah *et al.*, 1993;

Le Gac *et al.*, 1993; Schulz *et al.*, 2001). Ces hormones peuvent donc moduler la synthèse des hormones stéroïdiennes par la gonade. Les stéroïdes sexuels, et notamment l'œstradiol, synthétisés par la gonade peuvent alors exercer un rétrocontrôle positif et/ou négatif sur le cerveau et l'hypophyse (Trudeau *et al.*, 1991; Trudeau *et al.*, 1992; Montero *et al.*, 1995; Zou *et al.*, 1997; Dickey and Swanson, 1998; Lee *et al.*, 2001a; Schmitz *et al.*, 2005; Vetillard *et al.*, 2006). La perturbation de la synthèse d'œstrogènes chez les poissons serait donc potentiellement capable de perturber l'axe hypothalamus-hypophyse-gonades et par ce biais le processus de reproduction.

## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Face aux risques qu'exercent les perturbateurs endocriniens sur la reproduction des poissons, la mise en place d'outils permettant une détection précoce des altérations de la reproduction (biomarqueurs) paraît nécessaire. Les perturbateurs endocriniens sont des xénobiotiques aux modes d'actions complexes puisqu'ils sont susceptibles d'agir sur les différentes étapes du processus de la régulation endocrinienne et il existe un réel besoin d'amélioration des connaissances des effets de perturbateurs endocriniens sur l'expression de gènes cibles étroitement impliqués dans le processus de reproduction.

Dans notre travail, nous nous sommes attachés à l'étude de l'expression des aromatasés cérébrales et gonadiques chez le poisson comme marqueurs biologiques potentiels d'une perturbation endocrinienne. Ce travail a permis d'apporter des informations nouvelles et complémentaires sur différents aspects des P450 aromatasés tant en terme d'expression que de perturbation. Il a permis :

(i) de développer de nouveaux outils moléculaires et biochimiques qui permettent d'étudier l'expression des P450 aromatasés chez le poisson à différents niveaux cellulaires (gènes, protéines, activités enzymatiques).

(ii) d'acquérir des données originales sur la caractérisation biochimique et moléculaire des P450 aromatasés ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $PM$ ) et sur l'identification des cellules exprimant l'aromatase B dans le cerveau chez le poisson zèbre confirmant que cette protéine s'exprime exclusivement dans les cellules gliales radiaires chez le poisson.

(iii) de déterminer les profils d'expression des gènes *cyp19a* et *cyp19b* et protéine *aroB* et les activités enzymatiques des aromatasés en fonction des tissus cibles, du sexe et de la maturité sexuelle chez le poisson zèbre adulte. Les informations apportées dans ce travail confirment les données existantes chez le poisson zèbre et chez d'autres téléostéens notamment en ce qui concernent les exceptionnelles capacités d'aromatation dans le cerveau des adultes. Pour autant, les résultats fournis sont originaux et ont permis de confronter chez la même espèce, le poisson zèbre, et au sein de deux tissus cibles, le cerveau et les gonades, les données d'expression des gènes aromatasés à celles obtenues aux niveaux protéiques et enzymatiques. Nos travaux mettent ainsi en avant l'existence d'un dimorphisme sexuel d'expression de la protéine *aroB* et des activités enzymatiques dans le cerveau et les gonades.

(iv) de montrer que les aromatasés cérébrales et gonadiques sont des cibles moléculaires et biochimiques de substances chimiques. Nos travaux menés *in vitro* à l'aide d'un test sur microsomes de cerveaux et de gonades de truite arc-en-ciel ont permis de mieux cerner la nature des substances chimiques potentiellement capables de perturber les activités d'aromatation et susceptibles d'être responsables des effets observés *in situ*. Parmi les 43 substances testées, les pesticides de la famille des imidazoles se caractérisent par leurs aptitudes à inhiber les activités d'aromatations et parmi eux, le clotrimazole, un fongicide à usage pharmaceutique, s'est avéré particulièrement actif.

(v) de montrer qu'*in vivo*, les (xéno)-œstrogènes sont capables d'induire l'expression de l'aromatase cérébrale par un mécanisme ER-dépendant. La mesure de l'aromatase cérébrale constitue un marqueur biologique des œstrogènes mimétiques dont l'induction apparaît comme très sensible chez les larves de poissons et confirme la sensibilité des poissons aux stades embryo-larvaires vis-à-vis des substances œstrogéniques (Brion *et al.*, 2004). *In vivo*, les xéno-œstrogènes inhibent l'aromatase ovarienne mais les mécanismes d'action précis ne sont pas connus démontrant des effets différents de ces substances dans le cerveau et les gonades et par la même la complémentarité des mesures de P450 aromatasés dans ces deux tissus pour l'évaluation des effets endocrines des substances chimiques.

(vi) d'évaluer les effets *in vivo* de deux molécules, l'ATD et le clotrimazole, dont le potentiel d'inhibition des activités enzymatique P450 aromatasés ont été montré *in vitro* dans cette étude. Si *in vivo* les effets de l'ATD confirment le mode d'action *in vitro* de cette molécule, ceux du clotrimazole se révèlent plus complexes que ceux initialement envisagés et reflètent probablement les modes d'actions multiples de cette molécule. Par ailleurs, les effets observés au niveau des gènes *cyp19* ne reflètent pas nécessairement ceux sur la protéine fonctionnelle, montrant ainsi l'importance d'étudier les perturbations des aromatasés à différents niveaux d'expression (ARNm, protéine, ou activité aromatase).

Globalement, l'objectif que nous nous étions fixé de développer de nouveaux marqueurs biologiques d'une perturbation endocrinienne a été atteint. Nos travaux permettent de mieux appréhender les mécanismes d'actions et les effets des perturbateurs endocriniens chez le poisson. Ils soulèvent la question des effets neuro-endocrines des perturbateurs endocriniens qui font l'objet de peu d'études tout au moins chez les poissons (Mariussen and Fonnum,

2006) et permettent de considérer les effets moléculaires et biochimiques de ces molécules chez les femelles chez qui les effets endocrines ont été très peu étudiés.

Cependant, la question des perturbations de l'expression des aromatasés en terme d'effets avérés sur la physiologie et la reproduction reste à élucider. Bien que les effets aient été systématiquement étudiés dans le cerveau et les gonades, il convient de considérer que ces deux tissus communiquent entre eux de manière intime. Se pose alors la question de l'effet de la perturbation des aromatasés sur le fonctionnement de l'axe hypothalamus-hypophyse-gonades. La synthèse d'œstradiol au niveau ovarien étant étroitement impliquée dans le contrôle de la vitellogénèse, il serait souhaitable de s'interroger sur l'impact d'une perturbation d'aromatase au niveau ovarien sur la synthèse hépatique de vitellogénine et des conséquences possible que cela pourrait engendrer sur la qualité des œufs. Enfin, les aromatasés étant étroitement impliqués dans le processus de différenciation sexuelle du poisson, il s'agirait d'orienter les travaux dans ce sens. Mais quel que soit les voies d'exploration, l'approche consistant à déterminer les impacts fonctionnels de la perturbations des aromatasés implique la conduite d'expérimentations complexes associant à la mesure des aromatasés l'analyse de variables biologiques multiples à des niveaux d'organisation biologique différents (altérations histologiques des gonades, la fécondité, la fertilité) qui n'ont pu être entreprises dans le cadre forcément limité de cette thèse.

Enfin, il faut rappeler que la stéroïdogénèse est un processus complexe supporté par une cascade d'enzymes. Il s'agirait donc de déterminer dans quelles mesures, les perturbateurs endocriniens sont capables d'affecter les autres enzymes impliquées dans la biosynthèse hormonale. Les travaux réalisés au laboratoire sur le cytochrome P450c17 vont dans ce sens et viennent compléter avantageusement les données obtenues dans ce travail en déterminant des effets au niveau testiculaire. Idéalement, il s'agirait d'étudier simultanément au sein des différents tissus cibles l'ensemble des gènes de la stéroïdogénèse et des protéines correspondantes et on pourra militer pour une démarche de type « génomique, protéomique fonctionnelle » dédiée à l'étude des effets des perturbateurs endocriniens sur la stéroïdogénèse chez le poisson.





## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aït-Aïssa, S., Laville, N., Brion, F., Lemaire, G., Hinfray, N., Porcher, J.M., Balaguer, P., 2006, *In vitro assessment of the potency of pesticides to interact with multiple molecular endocrine targets.*, 2nd International Conference on Molecular Research in Environmental Medicine, Paris, Septembre 7-8, 2006,
- Alberti, M., Kausch, U., Haindl, S., Seifert, M., 2005. Gene Expression Analysis for Exposure to Estrogenic Substances. *Acta hydrochimica et hydrobiologica*, 33 (1), 38-44.
- Andersen, H.R., Vinggaard, A.M., Rasmussen, T.H., Gjermansen, I.M., Bonefeld-Jorgensen, E.C., 2002. Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity, and aromatase activity in vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 179 (1), 1-12.
- Andersen, L., Bjerregaard, P., Korsgaard, B., 2003. Vitellogenin induction and brain aromatase activity in adult male and female zebrafish exposed to endocrine disrupters. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28 (1-4), 319-321.
- Andersen, L., Kazeto, R., Trant, J.M., 2004, Effect of low concentrations of methyltestosterone and ethinylestradiol alone or in combination on the endocrine system of zebrafish (*Danio rerio*), 14th European Congress of the SETAC, Prague, 18-22 April.
- Andersen, L., Goto-Kazeto, R., Trant, J.M., Nash, J.P., Korsgaard, B., Bjerregaard, P., 2006. Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 76 (3-4), 343-352.
- Ankley, G.T., Kahl, M.D., Jensen, K.M., Hornung, M.W., Korte, J.J., Makynen, E.A., Leino, R.L., 2002. Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicological Sciences*, 67 (1), 121-130.
- Ankley, G.T., Jensen, K.M., Durhan, E.J., Makynen, E.A., Butterworth, B.C., Kahl, M.D., Villeneuve, D.L., Linnum, A., Gray, L.E., Cardon, M., Wilson, V.S., 2005. Effects of two fungicides with multiple modes of action on reproductive endocrine function in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicological Sciences*, 86 (2), 300-308.
- Anthony, T.E., Klein, C., Fishell, G., Heintz, N., 2004. Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system. *Neuron*, 41 (6), 881-890.
- Bakker, J., Honda, S., Harada, N., Balthazart, J., 2002. The aromatase knock-out mouse provides new evidence that estradiol is required during development in the female for the expression of sociosexual behaviors in adulthood. *Journal of Neuroscience*, 22 (20), 9104-9112.
- Balthazart, J., Baillien, M., Ball, G.F., 2001. Phosphorylation processes mediate rapid changes of brain aromatase activity. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 79 (1-5), 261-277.

- Baroiller, J.F., Guiguen, Y., Fostier, A., 1999. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 55, 910-931.
- Baroiller, J.F., D'Cotta, H., 2001. Environment and sex determination in farmed fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 130 (4), 399-409.
- Baron, D., Guiguen, Y., 2003. Gene expression during gonadal sex differentiation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): from candidate genes studies to high throughput genomic approach. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28 (1 - 4), 119-123.
- Behl, C., 2002. Oestrogen as a neuroprotective hormone. *Nature Reviews Neuroscience*, 3 (6), 433-442.
- Bhandari, R.K., Nakamura, M., Kobayashi, T., Nagahama, Y., 2006. Suppression of steroidogenic enzyme expression during androgen-induced sex reversal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *General and Comparative Endocrinology*, 145 (1), 20-24.
- Bjerselius, R., Lundstedt-Enkel, K., Olsen, H., Mayer, I., Dimberg, K., 2001. Male goldfish reproductive behaviour and physiology are severely affected by exogenous exposure to 17[ $\beta$ ]-estradiol. *Aquatic Toxicology*, 53 (2), 139-152.
- Black, M.P., Balthazart, J., Baillien, M., Grober, M.S., 2005. Socially induced and rapid increases in aggression are inversely related to brain aromatase activity in a sex-changing fish, *Lythrypnus dalli*. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society.*, 272 (1579), 2435-2440.
- Blazquez, M., Felip, A., Zanuy, S., Carrillo, M., Piferrer, F., 2001. Critical period of androgen-inducible sex differentiation in a teleost fish, the European sea bass. *Journal of Fish Biology*, 58 (2), 342-358.
- Blazquez, M., Piferrer, F., 2004. Cloning, sequence analysis, tissue distribution, and sex-specific expression of the neural form of P450 aromatase in juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Molecular and Cellular Endocrinology*, 219 (1-2), 83-94.
- Bortone, S.A., Davis, W.P., Bundrick, C.M., 1989. Morphological and behavioral characters in mosquitofish as potential bioindication of exposure to kraft mill effluent. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 43 (3), 370-377.
- Brion, F., Paluzzi, X., Babut, M., Garric, J., Maddix, S., Migeon, B., Noury, P., Porcher, J.-M., Thybaud, E., Tyler, C., Flammarion, P., 2000. Estrogenic effects in chub (*Leuciscus cephalus*) : induction of vitellogenin and alterations in testicular structure, 3<sup>rd</sup> SETAC WORLD Congress, Brighton, 21-25 may
- Brion, F., Tyler, C.R., Paluzzi, X., Laillet, B., Porcher, J.M., Garric, J., Flammarion, P., 2004. Impacts of 17 beta-estradiol, including environmentally relevant concentrations, on reproduction after exposure during embryo-larval-, juvenile- and adult-life stages in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 68 (3), 193-217.

Callard, G.V., Tchoudakova, A.V., Kishida, M., Wood, E., 2001. Differential tissue distribution, developmental programming, estrogen regulation and promoter characteristics of cyp19 genes in teleost fish. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 79 (1-5), 305-314.

Campbell, K., Gotz, M., 2002. Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development. *Trends in Neurosciences*, 25 (5), 235-238.

Carreau, S., Bourguiba, S., Lambard, S., Galeraud-Denis, I., Genissel, C., Levallet, J., 2002. Reproductive system: aromatase and estrogens. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 193 (1-2), 137-143.

Chang, X., Kobayashi, T., Senthilkumaran, B., Kobayashi-Kajura, H., Sudhakumari, C.C., Nagahama, Y., 2005. Two types of aromatase with different encoding genes, tissue distribution and developmental expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *General and Comparative Endocrinology*, 141 (2), 101-115.

Charles, G.D., Bartels, M.J., Zacharewski, T.R., Gollapudi, B.B., Freshour, N.L., Carney, E.W., 2000. Activity of benzo[a]pyrene and its hydroxylated metabolites in an estrogen receptor-alpha reporter gene assay. *Toxicological Sciences*, 55 (2), 320-326.

Cheshenko, K., Brion, F., Le Page, Y., Hinfrey, N., Pakdel, F., Kah, O., Segner, H., Eggen, R., soumis. Expression of Zebrafish Aromatase cyp19a and cyp19b Genes in Response to the Ligands of Estrogen Receptor and Aryl Hydrocarbon Receptor. *Toxicological Sciences*, soumis.

Chiang, E.F., Yan, Y.L., Guiguen, Y., Postlethwait, J., Chung, B., 2001. Two Cyp19 (P450 aromatase) genes on duplicated zebrafish chromosomes are expressed in ovary or brain. *Molecular Biology and Evolution*, 18 (4), 542-550.

Conley, A., Hinshelwood, M., 2001. Mammalian aromatases. *Reproduction*, 121 (5), 685-695.

Contractor, R.G., Foran, C.M., Li, S., Willett, K.L., 2004. Evidence of gender- and tissue-specific promoter methylation and the potential for ethinylestradiol-induced changes in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) estrogen receptor and aromatase genes. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 67 (1), 1-22.

Corbin, C.J., Khalil, M.W., Conley, A.J., 1995. Functional ovarian and placental isoforms of porcine aromatase. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 113 (1), 29-37.

Dalla Valle, L., Ramina, A., Vianello, S., Belvedere, P., Colombo, L., 2002. Cloning of two mRNA variants of brain aromatase cytochrome P450 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss Walbaum*). *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 82 (1), 19-32.

D'Cotta, H., Fostier, A., Guiguen, Y., Govoroun, M., Baroiller, J.-F., 2001. Aromatase plays a key role during normal and temperature-induced sex differentiation of tilapia *Oreochromis niloticus*. *Molecular Reproduction and Development*, 59 (3), 265-276.

- Dickey, J.T., Swanson, P., 1998. Effects of sex steroids on gonadotropin (FSH and LH) regulation in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Journal of Molecular Endocrinology*, 21 (3), 291-306.
- Duhm, B., Medenwald, H., Puetter, J., Maul, W., Patzschke, K., Wegner, L.A., 1974. The pharmacokinetics of clotrimazole 14C. *Postgraduate Medical Journal*, 50 (Suppl 1), 13-16.
- EPA, U.S., 2005. Final detailed review paper on aromatase.
- Fenske, M., Segner, H., 2004. Aromatase modulation alters gonadal differentiation in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 67 105-126.
- Fisher, C.R., Graves, K.H., Parlow, A.F., Simpson, E.R., 1998. Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the *cyp19* gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences (of the U S A)*, 95 (12), 6965-6970.
- Forlano, P.M., Deitcher, D.L., Myers, D.A., Bass, A.H., 2001. Anatomical distribution and cellular basis for high levels of aromatase activity in the brain of teleost fish: aromatase enzyme and mRNA expression identify glia as source. *Journal of Neuroscience*, 21 (22), 8943-8955.
- Fossi, M.C., Casini, S., Marsili, L., Neri, G., Mori, G., Ancora, S., Moscatelli, A., Ausili, A., Notarbartolo-di-Sciara, G., 2002. Biomarkers for endocrine disruptors in three species of Mediterranean large pelagic fish. *Marine Environmental Research*, 54 (3-5), 667-671.
- Fukada, S., Tanaka, M., Matsuyama, M., Kobayashi, D., Nagahama, Y., 1996. Isolation, characterization, and expression of cDNAs encoding the medaka (*Oryzias latipes*) ovarian follicle cytochrome P-450 aromatase. *Molecular Reproduction and Development*, 45 (3), 285-290.
- Gelinas, D., A. Pitoc, G., V. Callard, G., 1998. Isolation of a goldfish brain cytochrome P450 aromatase cDNA : mRNA expression during the seasonal cycle and after steroid treatment. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 138 (1-2), 81-93.
- Gen, K., Okuzawa, K., Kumakura, N., Yamaguchi, S., Kagawa, H., 2001. Correlation between messenger RNA expression of cytochrome P450 aromatase and its enzyme activity during oocyte development in the red seabream (*Pagrus major*). *Biology of Reproduction*, 65 (4), 1186-1194.
- Gibbs, P.E., Bryan, G.W., 1986. Reproductive failure in populations of the dog-whelk, *Nucella lapillus*, caused by imposex induced by tributyltin from antifouling paints. *Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom*, 66 767-777.
- Gonzalez, A., Piferrer, F., 2002. Characterization of aromatase activity in the sea bass: effects of temperature and different catalytic properties of brain and ovarian homogenates and microsomes. *Journal of Experimental Zoology*, 293 (5), 500-510.
- Gonzalez, A., Piferrer, F., 2003. Aromatase activity in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*) brain. Distribution and changes in relation to age, sex, and the annual reproductive cycle. *General and Comparative Endocrinology*, 132 (2), 223-230.

- Goto-Kazeto, R., Kight, K.E., Zohar, Y., Place, A.R., Trant, J.M., 2004. Localization and expression of aromatase mRNA in adult zebrafish. *General and Comparative Endocrinology*, 139 (1), 72-84.
- Govoroun, M., McMeel, O.M., D'Cotta, H., Ricordel, M.J., Smith, T., Fostier, A., Guiguen, Y., 2001. Steroid enzyme gene expressions during natural and androgen-induced gonadal differentiation in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Experimental Zoology*, 290 (6), 558-566.
- Greytak, S.R., Champlin, D., Callard, G.V., 2005. Isolation and characterization of two cytochrome P450 aromatase forms in killifish (*Fundulus heteroclitus*): Differential expression in fish from polluted and unpolluted environments. *Aquatic Toxicology*, 71 (4), 371-389.
- Guiguen, Y., Baroiller, J.-F., Ricordel, M.-J., Iseki, K., McMeel, O.M., Martin, S.A.M., Fostier, A., 1999. Involvement of estrogens in the process of sex differentiation in two fish species: The rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and a tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Molecular Reproduction and Development*, 54 (Issue 2), 154-162.
- Hallgren, S.L.E., Linderoth, M., Olsen, K.H., 2006. Inhibition of cytochrome p450 brain aromatase reduces two male specific sexual behaviours in the male Endler guppy (*Poecilia reticulata*). *General and Comparative Endocrinology*, 147 (3), 323-328.
- Halm, S., Pounds, N., Maddix, S., Rand-Weaver, M., Sumpter, J.P., Hutchinson, T.H., Tyler, C.R., 2002. Exposure to exogenous 17[beta]-oestradiol disrupts P450aromB mRNA expression in the brain and gonad of adult fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Aquatic Toxicology*, 60 (3-4), 285-299.
- Harada, N., Honda, S.I., Hatano, O., 1999. Aromatase inhibitors and enzyme stability. *Endocrine Related Cancer*, 6 (2), 211-218.
- Harries, J.E., Sheahan, D.A., Jobling, S., Matthiessen, P., Neall, P., Routledge, E.J., Rycroft, R., Sumpter, J.P., Tylor, T., 1996. A survey of estrogenic activity in United Kingdom inland waters. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15 (11), 1993-2002.
- Hecker, M., Newsted, J.L., Murphy, M.B., Higley, E.B., Jones, P.D., Wu, R., Giesy, J.P., Human adrenocarcinoma (H295R) cells for rapid *in vitro* determination of effects on steroidogenesis: Hormone production. *Toxicology and Applied Pharmacology*, In Press a, Accepted Manuscript
- Hecker, M., Thomas Sanderson, J., Karbe, L., Suppression of aromatase activity in populations of bream (*Abramis brama*) from the river Elbe, Germany. *Chemosphere*, In Press b, Corrected Proof
- Heneweer, M., van den Berg, M., Sanderson, J.T., 2004. A comparison of human H295R and rat R2C cell lines as *in vitro* screening tools for effects on aromatase. *Toxicology Letters*, 146 (2 S), 183-194.

Heneweer, M., van den Berg, M., de Geest, M.C., de Jong, P.C., Bergman, A., Sanderson, J.T., 2005. Inhibition of aromatase activity by methyl sulfonyl PCB metabolites in primary culture of human mammary fibroblasts. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 202 (1), 50-58.

Hornung, M.W., Jensen, K.M., Korte, J.J., Kahl, M.D., Durhan, E.J., Denny, J.S., Henry, T.R., Ankley, G.T., 2004. Mechanistic basis for estrogenic effects in fathead minnow (*Pimephales promelas*) following exposure to the androgen 17[alpha]-methyltestosterone: conversion of 17[alpha]-methyltestosterone to 17[alpha]-methylestradiol. *Aquatic Toxicology*, 66 (1), 15-23.

Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle, P.M., Bergman, H.L., 1992. Biomarkers: biochemical, physiological and histological makers of anthropogenic stress. SETAC Special Publication Series, Lewis Publishers, Chelsea, US 347p.

Ijiri, S., Takei, N., Kazeto, Y., Todo, T., Adachi, S., Yamauchi, K., 2006. Changes in localization of cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage (P450scc) in Japanese eel testis and ovary during gonadal development. *General and Comparative Endocrinology*, 145 (1), 75-83.

Ing, N.H., 2005. Steroid hormones regulate gene expression posttranscriptionally by altering the stabilities of messenger RNAs. *Biology of Reproduction*, 72 (6), 1290-1296.

Ings, J.S., Van Der Kraak, G.J., 2006. Characterization of the mRNA expression of StAR and steroidogenic enzymes in zebrafish ovarian follicles. *Molecular Reproduction and Development*, 73 (8), 943-954.

Inudo, M., Ishibashi, H., Matsumura, N., Matsuoka, M., Mori, T., Taniyama, S., Kadokami, K., Koga, M., Shinohara, R., Hutchinson, T.H., Iguchi, T., Arizono, K., 2004. Effect of estrogenic activity, and phytoestrogen and organochlorine pesticide contents in an experimental fish diet on reproduction and hepatic vitellogenin production in medaka (*Oryzias latipes*). *Comparative Medicine*, 54 (6), 673-680.

Islinger, M., Yuan, H., Voelkl, A., Braunbeck, T., 2002. Measurement of vitellogenin gene expression by RT-PCR as a tool to identify endocrine disruption in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Biomarkers*, 7 (1), 80-93.

Kagawa, H., Gen, K., Okuzawa, K., Tanaka, H., 2003. Effects of Luteinizing Hormone and Follicle-Stimulating Hormone and Insulin-Like Growth Factor-I on Aromatase Activity and P450 Aromatase Gene Expression in the Ovarian Follicles of Red Seabream, *Pagrus major*. *Biology of Reproduction*, 68 (5), 1562-1568.

Kah, O., Anglade, I., Leprêtre, E., Dubourg, P., de Monbrison, D., 1993. The reproductive brain in fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 11 (1-6), 85-98.

Kallivretaki, E., Eggen, R., Neuhaus, S., Alberti, M., Kausch, U., Segner, H., 2006. Aromatase in zebrafish: A potential target for endocrine disrupting chemicals. *Marine Environmental Research*, 62 (Supplement 1), S187-S190.

Kanda, H., Okubo, T., Omori, N., Niihara, H., Matsumoto, N., Yamada, K., Yoshimoto, S., Ito, M., Yamashita, S., Shiba, T., Takamatsu, N., 2006. Transcriptional regulation of the

rainbow trout CYP19a gene by FTZ-F1 homologue. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 99 (2-3), 85-92.

Kavlock, R.J., Daston, G.P., DeRosa, C., Fenner-Crisp, P., Gray, L.E., Kaattari, S., Lucier, G., Luster, M., Mac, M.J., Maczka, C., Miller, R., Moore, J., Rolland, R., Scott, G., Sheehan, D.M., Sinks, T., Tilson, H.A., 1996. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environmental Health Perspectives*, 104 Suppl 4 715-740.

Kazeto, Y., Ijiri, S., Place, A.R., Zohar, Y., Trant, J.M., 2001. The 5'-flanking regions of CYP19A1 and CYP19A2 in zebrafish. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 288 (3), 503-508.

Kazeto, Y., Goto-Kazeto, R., Place, A.R., Trant, J.M., 2003. Aromatase expression in zebrafish and channel catfish brains: changes in transcript abundance associated with the reproductive cycle and exposure to endocrine disrupting chemicals. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28 (1-4), 29-32.

Kazeto, Y., Place, A.R., Trant, J.M., 2004. Effects of endocrine disrupting chemicals on the expression of CYP19 genes in zebrafish (*Danio rerio*) juveniles. *Aquatic Toxicology*, 69 (1), 25-34.

Kazeto, Y., Trant, J.M., 2005. Molecular biology of channel catfish brain cytochrome P450 aromatase (CYP19A2): cloning, preovulatory induction of gene expression, hormonal gene regulation and analysis of promoter region. *Journal of Molecular Endocrinology*, 35 (3), 571-583.

Kishida, M., Callard, G.V., 2001. Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in zebrafish (*Danio rerio*) brain and ovary are differentially programmed and estrogen regulated during early development. *Endocrinology*, 142 (2), 740-750.

Kishida, M., McLellan, M., Miranda, J.A., Callard, G.V., 2001. Estrogen and xenoestrogens upregulate the brain aromatase isoform (P450aromB) and perturb markers of early development in zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 129 (2-3), 261-268.

Kitano, T., Takamune, K., Nagahama, Y., Abe, S.I., 2000. Aromatase inhibitor and 17alpha-methyltestosterone cause sex-reversal from genetical females to phenotypic males and suppression of P450 aromatase gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Molecular Reproduction and Development*, 56 (1), 1-5.

Kobayashi, T., Nakamura, M., Kajiura-Kobayashi, H., Young, G., Nagahama, Y., 1998. Immunolocalization of steroidogenic enzymes (P450scc, P450c17, P450arom, and 3beta-HSD) in immature and mature testes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cell and Tissue Research*, 292 (3), 573-577.

Kobayashi, Y., Kobayashi, T., Nakamura, M., Sunobe, T., Morrey, C.E., Suzuki, N., Nagahama, Y., 2004. Characterization of two types of cytochrome P450 aromatase in the serial-sex changing gobiid fish, *Trimma okinawae*. *Zoological Science*, 21 (4), 417-425.

- Komatsu, T., Nakamura, S., Nakamura, M., 2006. Masculinization of female golden rabbitfish *Siganus guttatus* using an aromatase inhibitor treatment during sex differentiation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 143 (4), 402-409.
- Kuhl, A.J., Manning, S., Brouwer, M., 2005. Brain aromatase in Japanese medaka (*Oryzias latipes*): Molecular characterization and role in xenoestrogen-induced sex reversal. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 96 (1), 67-77.
- Kuhl, A.J., Brouwer, M., 2006. Antiestrogens inhibit xenoestrogen-induced brain aromatase activity but do not prevent xenoestrogen-induced feminization in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Health Perspectives*, 114 (4), 500-506.
- Kwon, J.Y., McAndrew, B.J., Penman, D.J., 2001. Cloning of brain aromatase gene and expression of brain and ovarian aromatase genes during sexual differentiation in genetic male and female Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Molecular Reproduction and Development*, 59 (4), 359-370.
- Laale, H.W., 1977. Culture and preliminary observations of follicular isolates from adult zebra fish, *Brachydanio rerio*. *Canadian Journal of Zoology*, 55 (2), 304-309.
- Larionov, A.A., Vasyliiev, D.A., Mason, J.I., Howie, A.F., Berstein, L.M., Miller, W.R., 2003. Aromatase in skeletal muscle. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 84 (4), 485-492.
- Lavado, R., Thibaut, R., Raldua, D., Martin, R., Porte, C., 2004. First evidence of endocrine disruption in feral carp from the Ebro River. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 196 (2), 247-257.
- Laville, N., Balaguer, P., Brion, F., Hinfrey, N., Casellas, C., Porcher, J.-M., Ait-Aissa, S., 2006. Modulation of aromatase activity and mRNA by various selected pesticides in the human choriocarcinoma JEG-3 cell line. *Toxicology*, 228 (1), 98-108.
- Le Bail, J.C., Laroche, T., Marre-Fournier, F., Habrioux, G., 1998. Aromatase and 17[beta]-hydroxysteroid dehydrogenase inhibition by flavonoids. *Cancer Letters*, 133 (1), 101-106.
- Le Bail, J.C., Champavier, Y., Chulia, A.J., Habrioux, G., 2000. Effects of phytoestrogens on aromatase, 3beta and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase activities and human breast cancer cells. *Life Sciences*, 66 (14), 1281-1291.
- Le Gac, F., Blaise, O., Fostier, A., Le Bail, P.-Y., Loir, M., Mourot, B., Weil, C., 1993. Growth Hormone (GH) and reproduction: a review. *Fish Physiology and Biochemistry*, 11, 219-232.
- Le Page, Y., Scholze, M., Kah, O., Pakdel, F., 2006. Assessment of xenoestrogens using three distinct estrogen receptors and the zebrafish brain aromatase gene in a highly responsive glial cell system. *Environmental Health Perspectives*, 114 (5), 752-758.
- Lee, Y.H., Lee, F.Y., Yueh, W.S., Tacon, P., Du, J.L., Chang, C.N., Jeng, S.R., Tanaka, H., Chang, C.F., 2000. Profiles of gonadal development, sex steroids, aromatase activity, and



gonadotropin II in the controlled sex change of protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli* Bleeker. *General and Comparative Endocrinology*, 119 (1), 111-120.

Lee, Y.H., Du, J.L., Yen, F.P., Lee, C.Y., Dufour, S., Huang, J.D., Sun, L.T., Chang, C.F., 2001a. Regulation of plasma gonadotropin II secretion by sex steroids, aromatase inhibitors, and antiestrogens in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli* Bleeker. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B : Biochemistry and Molecular Biology*, 129 (2-3), 399-406.

Lee, Y.H., Du, J.L., Yueh, W.S., Lin, B.Y., Huang, J.D., Lee, C.Y., Lee, M.F., Lau, E.L., Lee, F.Y., Morrey, C., Nagahama, Y., Chang, C.F., 2001b. Sex change in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*: a review in gonadal development, estradiol, estrogen receptor, aromatase activity and gonadotropin. *Journal of Experimental Zoology*, 290 (7), 715-726.

Lee, Y.-M., Seo, J.S., Kim, I.-C., Yoon, Y.-D., Lee, J.-S., 2006. Endocrine disrupting chemicals (bisphenol A, 4-nonylphenol, 4-tert-octylphenol) modulate expression of two distinct cytochrome P450 aromatase genes differently in gender types of the hermaphroditic fish *Rivulus marmoratus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 345 (2), 894-903.

Lema, S.C., Hodges, M.J., Marchetti, M.P., Nevitt, G.A., 2005. Proliferation zones in the salmon telencephalon and evidence for environmental influence on proliferation rate. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A : Molecular and Integrative Physiology*, 141 (3), 327-335.

Lephart, E.D., 1996. A review of brain aromatase cytochrome P450. *Brain Research Reviews*, 22 (1), 1-26.

Lephart, E.D., 1997. Molecular aspects of brain aromatase cytochrome P450. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 61 (3-6), 375-380.

Letcher, R.J., van Holsteijn, I., Drenth, H.-J., Norstrom, R.J., Bergman, A., Safe, S., Pieters, R., van den Berg, M., 1999. Cytotoxicity and Aromatase (CYP19) Activity Modulation by Organochlorines in Human Placental JEG-3 and JAR Choriocarcinoma Cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 160 (1), 10-20.

Luckenbach, J.A., Early, L.W., Rowe, A.H., Borski, R.J., Daniels, H.V., Godwin, J., 2005. Aromatase cytochrome P450: cloning, intron variation, and ontogeny of gene expression in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*). *Journal of Experimental Zoology Part A : Comparative Experimental Biology*, 303 (8), 643-656.

Lye, C.M., Frid, C.L.J., Gill, M.E., McCormick, D., 1997. Abnormalities in the reproductive health of flounder *Platichthys flesus* exposed to effluent from a sewage treatment works. *Marine Pollution Bulletin*, 34 (1), 34-41.

Lyssimachou, A., Jenssen, B.M., Arukwe, A., 2006. Brain Cytochrome P450 Aromatase Gene Isoforms and Activity Levels in Atlantic Salmon after Waterborne Exposure to Nominal Environmental Concentrations of the Pharmaceutical Ethynylestradiol and Antifoulant Tributyltin. *Toxicological Sciences*, 91 (1), 82-92.

- Mariussen, E., Fonnum, F., 2006. Neurochemical targets and behavioral effects of organohalogen compounds: an update. *Critical Reviews in Toxicology*, 36 (3), 253-289.
- Martin-Skilton, R., Lavado, R., Thibaut, R., Minier, C., Porte, C., 2006. Evidence of endocrine alteration in the red mullet, *Mullus barbatus* from the NW Mediterranean. *Environmental Pollution*, 141 60-68.
- Matsumoto, T., Honda, S.-i., Harada, N., 2003. Neurological effects of aromatase deficiency in the mouse. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 86 (3-5), 357-365.
- Matsumoto, T., Kobayashi, M., Moriwaki, T., Kawai, S., Watabe, S., 2004. Survey of estrogenic activity in fish feed by yeast estrogen-screen assay. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Toxicology and Pharmacology*, 139 (1-3), 147-152.
- McAllister, B.G., Kime, D.E., 2003. Early life exposure to environmental levels of the aromatase inhibitor tributyltin causes masculinisation and irreversible sperm damage in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 65 (3), 309-316.
- Menuet, A., Pellegrini, E., Anglade, I., Blaise, O., Laudet, V., Kah, O., Pakdel, F., 2002. Molecular characterization of three estrogen receptor forms in zebrafish: binding characteristics, transactivation properties, and tissue distributions. *Biology of Reproduction*, 66 (6), 1881-1892.
- Menuet, A., Anglade, I., Le Guevel, R., Pellegrini, E., Pakdel, F., Kah, O., 2003. Distribution of aromatase mRNA and protein in the brain and pituitary of female rainbow trout: Comparison with estrogen receptor alpha. *Journal of Comparative Neurology*, 462 (2), 180-193.
- Menuet, A., Pellegrini, E., Brion, F., Gueguen, M.M., Anglade, I., Pakdel, F., Kah, O., 2005. Expression and estrogen-dependent regulation of the zebrafish brain aromatase gene. *Journal of Comparative Neurology*, 485 (4), 304-320.
- Meucci, V., Arukwe, A., 2005. Transcriptional modulation of brain and hepatic estrogen receptor and P450arom isoforms in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) after waterborne exposure to the xenoestrogen, 4-nonylphenol. *Aquatic Toxicology*, 77 (2), 167-177.
- Meucci, V., Arukwe, A., 2006. The environmental estrogen, 4-nonylphenol modulates brain estrogen-receptor- and aromatase (CYP19) isoforms gene expression patterns in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Marine Environmental Research*, 62 (S1), 95-99.
- Miles-Richardson, S.R., Kramer, V.J., Fitzgerald, S.D., Render, J.A., Yamini, B., Barbee, S.J., Giesy, J.P., 1999. Effects of waterborne exposure of 17 [beta]-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Aquatic Toxicology*, 47 (2), 129-145.
- Miracle, A.L., Ankley, G.T., 2005. Ecotoxicogenomics: linkages between exposure and effects in assessing risks of aquatic contaminants to fish. *Reproductive Toxicology*, 19 (3), 321-326.

Moccia, R.D., Leatherland, J.F., Sonstegard, R.A., 1981. Quantitative interlake comparison of thyroid pathology in Great Lakes coho (*Oncorhynchus kisutch*) and chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) salmon. *Cancer Research*, 41 (6), 2200-2210.

Monod, G., De Mones, A., Fostier, A., 1993. Inhibition of ovarian microsomal aromatase and follicular estradiol suppression by imidazole fungicides in rainbow trout. *Marine Environmental Research*, 35, 153-157.

Monod, G., Rime, H., Bobe, J., Jalabert, B., 2004. Agonistic effect of imidazole and triazole fungicides on *in vitro* oocyte maturation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Marine Environmental Research*, 58 (2-5), 143-146.

Monteiro, P.R.R., Reis-Henriques, M.A., Coimbra, J., 2000a. Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit *in vitro* ovarian steroidogenesis in the flounder (*Platichthys flesus* L.). *Aquatic Toxicology*, 48 (4), 549-559.

Monteiro, P.R.R., Reis-Henriques, M.A., Coimbra, J., 2000b. Plasma steroid levels in female flounder (*Platichthys flesus*) after chronic dietary exposure to single polycyclic aromatic hydrocarbons. *Marine Environmental Research*, 49 (5), 453-467.

Montero, M., Le Belle, N., King, J.A., Millar, R.P., Dufour, S., 1995. Differential regulation of the two forms of gonadotropin-releasing hormone (mGnRH and cGnRH-II) by sex steroids in the European female silver eel (*Anguilla anguilla*). *Neuroendocrinology*, 61 (5), 525-535.

Morinaga, H., Yanase, T., Nomura, M., Okabe, T., Goto, K., Harada, N., Nawata, H., 2004. A benzimidazole fungicide, benomyl, and its metabolite, carbendazim, induce aromatase activity in a human ovarian granulosa-like tumor cell line (KGN). *Endocrinology*, 145 (4), 1860-1869.

Munkittrick, K., Portt, C., Van Der Kraak, G., Smith, I., Rokosh, D., 1991. Impact of Bleached Kraft Mill Effluent on Population Characteristics, Liver MFO Activity, and Serum Steroid Levels of a Lake Superior White Sucker (*Catostomus commersoni*) Population. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 48 (8), 1371-1380.

Munkittrick, K., McMaster, M., Portt, C., Van der Kraak, G., Smith, I., Dixon, D., 1992a. Changes in maturity, plasma sex steroid levels, hepatic mixed-function oxygenase activity, and the presence of external lesions in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) exposed to bleached kraft mill effluent. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 49 (8), 1560-1569.

Munkittrick, K., van der Kraak, G., McMaster, M., Portt, C., 1992b. Response of hepatic MFO activity and plasma sex steroids to secondary treatment of bleached kraft pulp mill effluent and mill shutdown. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11 (10), 1427-1439.

Munkittrick, K., Van Der Kraak, G., 1994. Receiving water environmental effects associated with discharges from Ontario pulp mills. *Pulp & Paper-Canada*, 95 (5), 57-59.

Munkittrick, K., van der Kraak, G., McMaster, M., Portt, C., van den Heuvel, M., Servos, M., 1994. Survey of receiving-water environmental impacts associated with discharges from pulp mills. II. Gonad size, liver size, hepatic EROD activity and plasma sex steroid levels in white

sucker (*Catostomus commersoni*). Environmental Toxicology and Chemistry, 13 (7), 1089-1101.

Murata, Y., Robertson, K.M., Jones, M.E.E., Simpson, E.R., 2002. Effect of estrogen deficiency in the male: the ArKO mouse model. Molecular and Cellular Endocrinology, 193 (1-2), 7-12.

Nagahama, Y., Matsuhisa, A., Iwamatsu, T., Sakai, N., Fukada, S., 1991. A mechanism for the action of pregnant mare serum gonadotropin on aromatase activity in the ovarian follicle of the medaka, *Oryzias latipes*. Journal of Experimental Zoology, 259 (1), 53-58.

Navas, J.M., Chana, A., Herradon, B., Segner, H., 2004. Induction of cytochrome P4501A (CYP1A) by clotrimazole, a non-planar aromatic compound. Computational studies on structural features of clotrimazole and related imidazole derivatives. Life Sciences, 76 (6), 699-714.

Noaksson, E., Tjarnlund, U., Bosveld, A.T.C., Balk, L., 2001. Evidence for Endocrine Disruption in Perch (*Perca fluviatilis*) and Roach (*Rutilus rutilus*) in a Remote Swedish Lake in the Vicinity of a Public Refuse Dump. Toxicology and Applied Pharmacology, 174 (2), 160-176.

Noaksson, E., Linderoth, M., Bosveld, A.T., Norrgren, L., Zebuhr, Y., Balk, L., 2003. Endocrine disruption in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) exposed to leachate from a public refuse dump. The Science of the Total Environment, 305 (1-3), 87-103.

Noctor, S.C., Flint, A.C., Weissman, T.A., Wong, W.S., Clinton, B.K., Kriegstein, A.R., 2002. Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. Journal of Neuroscience, 22 (8), 3161-3173.

Nunez, B.S., Applebaum, S.L., Tissue- and sex-specific regulation of CYP19A1 expression in the Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*). General and Comparative Endocrinology, In Press, Corrected Proof

Odum, J., Ashby, J., 2002. Detection of aromatase inhibitors *in vitro* using rat ovary microsomes. Toxicology Letters, 129 (1-2), 119-122.

Ohno, K., Araki, N., Yanase, T., Nawata, H., Iida, M., 2004. A novel nonradioactive method for measuring aromatase activity using a human ovarian granulosa-like tumor cell line and an estrone ELISA. Toxicological Sciences, 82 (2), 443-450.

Ohtake, F., Takeyama, K., Matsumoto, T., Kitagawa, H., Yamamoto, Y., Nohara, K., Tohyama, C., Krust, A., Mimura, J., Chambon, P., Yanagisawa, J., Fujii-Kuriyama, Y., Kato, S., 2003. Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. Nature, 423 (6939), 545-550.

Orlando, E.F., Davis, W.P., Guillette, L.J., Jr., 2002. Aromatase activity in the ovary and brain of the eastern mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) exposed to paper mill effluent. Environmental Health Perspectives, 110 (Suppl 3) 429-433.

- Oshima, Y., Kang, I.J., Kobayashi, M., Nakayama, K., Imada, N., Honjo, T., 2003. Suppression of sexual behavior in male Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 17[ $\beta$ ]-estradiol. *Chemosphere*, 50 (3), 429-436.
- Parks, L.G., Cheek, A.O., Denslow, N.D., Heppell, S.A., McLachlan, J.A., LeBlanc, G.A., Sullivan, C.V., 1999. Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 123 (2), 113-125.
- Parnavelas, J.G., Nadarajah, B., 2001. Radial glial cells. Are they really glia? *Neuron*, 31 (6), 881-884.
- Pasmanik, M., Callard, G.V., 1985. Aromatase and 5 alpha-reductase in the teleost brain, spinal cord, and pituitary gland. *General and Comparative Endocrinology*, 60 (2), 244-251.
- Pasmanik, M., Callard, G.V., 1988. Changes in brain aromatase and 5 alpha-reductase activities correlate significantly with seasonal reproductive cycles in goldfish (*Carassius auratus*). *Endocrinology*, 122, 1349-1356.
- Patel, M.R., Scheffler, B.E., Wang, L., Willett, K.L., 2006. Effects of benzo(a)pyrene exposure on killifish (*Fundulus heteroclitus*) aromatase activities and mRNA. *Aquatic Toxicology*, 77 (3), 267-278.
- Patino, R., Yoshizaki, G., Thomas, P., Kagawa, H., 2001. Gonadotropic control of ovarian follicle maturation: the two-stage concept and its mechanisms. *Comparative Biochemistry and Physiology part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 129 (2-3), 427-439.
- Pelissero, C., Lenczowski, M.J.P., Chinzi, D., Davail-Cuisset, B., Sumpster, J.P., Fostier, A., 1996. Effects of flavonoids on aromatase activity, an *in vitro* study. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 57 (3-4), 215-223.
- Pellegrini, E., Menuet, A., Lethimonier, C., Adrio, F., Gueguen, M.-M., Tascon, C., Anglade, I., Pakdel, F., Kah, O., 2005. Relationships between aromatase and estrogen receptors in the brain of teleost fish. *General and Comparative Endocrinology*, 142 (1-2), 60-66.
- Pellegrini, E., Mouriec, K., Anglade, I., Menuet, A., Le Page, Y., Gueguen, M., Marmigon, M., Brion, F., Pakdel, F., Kah, O., In press. Aromatase identifies radial cells as progenitor cells in the ventricular layer of the forebrain in adult zebrafish. *Journal of Comparative Neurology*.
- Peter, R.E., Trudeau, V.L., Soley, B.D., 1991. Brain regulation of reproduction in teleosts. *Bulletin of the Institute of Zoology (Tapei) Academica Sinica Monograph*, 16, 89-118.
- Phillips, R.B., Ihssen, P.E., 1985. Identification of sex chromosomes in lake trout (*Salvelinus namaycush*). *Cytogenetics and Cell Genetics*, 39 (1), 14-18.
- Piferrer, F., Blázquez, M., 2005. Aromatase distribution and regulation in fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 31 (2), 215-226.

Purdom, C.E., Hardiman, P.A., Bye, V.J., Eno, N.C., Tyler, C.R., Sumpter, J.P., 1994. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Journal of Chemical Ecology*, 8, 275-285.

Rabe, T., Rabe, D., Runnebaum, B., 1982. New aromatase assay and its application for inhibitory studies of aminoglutethimide on microsomes of human term placenta. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 17 (3), 305-309.

Rice, S., Mason, H.D., Whitehead, S.A., 2006. Phytoestrogens and their low dose combinations inhibit mRNA expression and activity of aromatase in human granulosa-luteal cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 101 (4-5), 216-225.

Roberts, P.H., Thomas, K.V., 2006. The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment. *Science of The Total Environment*, 356 (1-3), 143-153.

Robertson, K.M., O'Donnell, L., Jones, M.E., Meachem, S.J., Boon, W.C., Fisher, C.R., Graves, K.H., McLachlan, R.I., Simpson, E.R., 1999. Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (cyp 19) gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences (of the U S A)*, 96 (14), 7986-7991.

Rodriguez-Mari, A., Yan, Y.-L., BreMiller, R.A., Wilson, C., Canestro, C., Postlethwait, J.H., 2005. Characterization and expression pattern of zebrafish anti-Mullerian hormone (amh) relative to sox9a, sox9b, and cyp19a1a, during gonad development. *Gene Expression Patterns*, 5 (5), 655-667.

Saarinen, N., Joshi, S.C., Ahotupa, M., Li, X., Ammala, J., Makela, S., Santti, R., 2001. No evidence for the *in vivo* activity of aromatase-inhibiting flavonoids. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 78 (3), 231-239.

Safe, S., Wang, F., Porter, W., Duan, R., McDougal, A., 1998. Ah receptor agonists as endocrine disruptors: antiestrogenic activity and mechanisms. *Toxicology Letters*, 102-103, 343-347.

Saitoh, M., Yanase, T., Morinaga, H., Tanabe, M., Mu, Y.-M., Nishi, Y., Nomura, M., Okabe, T., Goto, K., Takayanagi, R., Nawata, H., 2001. Tributyltin or Triphenyltin Inhibits Aromatase Activity in the Human Granulosa-like Tumor Cell Line KGN\*1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 289 (1), 198-204.

Sampath Kumar, R., Ijiri, S., Trant, J.M., 2000. Changes in the expression of genes encoding steroidogenic enzymes in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) ovary throughout a reproductive cycle. *Biology of Reproduction*, 63 (6), 1676-1682.

Sanderson, J.T., Seinen, W., Giesy, J.P., van den Berg, M., 2000. 2-Chloro-s-triazine herbicides induce aromatase (CYP19) activity in H295R human adrenocortical carcinoma cells: a novel mechanism for estrogenicity? *Toxicological Sciences*, 54 (1), 121-127.

Sanderson, J.T., Letcher, R.J., Heneweer, M., Giesy, J.P., van den Berg, M., 2001. Effects of chloro-s-triazine herbicides and metabolites on aromatase activity in various human cell lines

and on vitellogenin production in male carp hepatocytes. *Environmental Health Perspectives*, 109 (10), 1027-1031.

Sanderson, J.T., Boerma, J., Lansbergen, G.W.A., van den Berg, M., 2002. Induction and Inhibition of Aromatase (CYP19) Activity by Various Classes of Pesticides in H295R Human Adrenocortical Carcinoma Cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 182 (1), 44-54.

Sanderson, J.T., Hordijk, J., Denison, M.S., Springsteel, M.F., Nantz, M.H., van den Berg, M., 2004. Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by natural and synthetic flavonoid compounds in H295R human adrenocortical carcinoma cells. *Toxicological Sciences*, 82 (1), 70-79.

Sawyer, S.J., Gerstner, K.A., Callard, G.V., 2006. Real-time PCR analysis of cytochrome P450 aromatase expression in zebrafish: Gene specific tissue distribution, sex differences, developmental programming, and estrogen regulation. *General and Comparative Endocrinology*, 142 (2), 108-117.

Schmitz, M., Aroua, S., Vidal, B., Le Belle, N., Elie, P., Dufour, S., 2005. Differential regulation of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone expression during ovarian development and under sexual steroid feedback in the European eel. *Neuroendocrinology*, 81 (2), 107-119.

Schulz, R.W., Vischer, H.F., Cavaco, J.E., Santos, E.M., Tyler, C.R., Goos, H.J., Bogerd, J., 2001. Gonadotropins, their receptors, and the regulation of testicular functions in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B : Biochemistry and Molecular Biology*, 129 (2-3), 407-417.

Segner, H., Carroll, K., Fenske, M., Janssen, C.R., Maack, G., Pascoe, D., Schafers, C., Vandenberg, G.F., Watts, M., Wenzel, A., 2003. Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA project. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54 (3), 302-314.

Sen, U., Mukherjee, D., Bhattacharyya, S.P., 2002. Seasonal changes in plasma steroid levels in Indian major carp *Labeo rohita*: influence of homologous pituitary extract on steroid production and development of oocyte maturational competence. *General and Comparative Endocrinology*, 128 (2), 123-134.

Senthilkumaran, B., Yoshikuni, M., Nagahama, Y., 2004. A shift in steroidogenesis occurring in ovarian follicles prior to oocyte maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 215 (1-2), 11-18.

Seralini, G.-E., Moslemi, S., 2001. Aromatase inhibitors: past, present and future. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 178 (1-2), 117-131.

Shilling, A.D., Carlson, D.B., Williams, D.E., 1999. Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, as a model for aromatase inhibition. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 70 (1-3), 89-95.

Shimasaki, Y., Kitano, T., Oshima, Y., Inoue, S., Imada, N., Honjo, T., 2003. Tributyltin causes masculinization in fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22 (1), 141-144.

- Shu, S.Y., Ju, G., Fan, L.Z., 1988. The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system. *Neuroscience Letters*, 85 (2), 169-171
- Simpson, E.R., Mahendroo, M.S., Means, G.D., Kilgore, M.W., Hinshelwood, M.M., Graham-Lorence, S., Amarneh, B., Ito, Y., Fisher, C.R., Michael, M.D., et al., 1994. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocrine Reviews*, 15 (3), 342-355.
- Singh, H., Griffith, R.W., Takahashi, A., Kawauchi, H., Thomas, P., Stegeman, J.J., 1988. Regulation of gonadal steroidogenesis in *Fundulus heteroclitus* by recombinant salmon growth hormone and purified salmon prolactin. *General and Comparative Endocrinology*, 72 (1), 144-153.
- Stresser, D.M., Turner, S.D., McNamara, J., Stocker, P., Miller, V.P., Crespi, C.L., Patten, C.J., 2000. A High-Throughput Screen to identify inhibitors of aromatase (CYP19). *Analytical Biochemistry*, 284 (2), 427-430.
- Sumpter, J.P., Jobling, S., 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health Perspectives*, 103 Suppl 7 173-178.
- Sumpter, J.P., 1998. Xenoendocrine disrupters - environmental impacts. *Toxicology Letters*, 102-103, 337-342.
- Suzuki, T., Kitamura, S., Khota, R., Sugihara, K., Fujimoto, N., Ohta, S., 2005. Estrogenic and antiandrogenic activities of 17 benzophenone derivatives used as UV stabilizers and sunscreens. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 203 (1), 9-17.
- Tanaka, M., Telecky, T.M., Fukada, S., Adachi, S., Chen, S., Nagahama, Y., 1992. Cloning and sequence analysis of the cDNA encoding P-450 aromatase (P450arom) from a rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ovary; relationship between the amount of P450arom mRNA and the production of oestradiol-17 beta in the ovary. *Journal of Molecular Endocrinology*, 8 (1), 53-61.
- Tchoudakova, A., Callard, G.V., 1998. Identification of multiple CYP19 genes encoding different cytochrome P450 aromatase isozymes in brain and ovary. *Endocrinology*, 139 (4), 2179-2189.
- Tchoudakova, A., Kishida, M., Wood, E., Callard, G.V., 2001. Promoter characteristics of two cyp19 genes differentially expressed in the brain and ovary of teleost fish. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 78 (5), 427-439.
- Thomas, K.V., Hilton, M.J., 2004. The occurrence of selected human pharmaceutical compounds in UK estuaries. *Marine Pollution Bulletin*, 49 (5-6), 436-444.
- Thompson, E.A., Jr., Siiteri, P.K., 1974. Utilization of oxygen and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate by human placental microsomes during aromatization of androstenedione. *Journal of Biological Chemistry*, 249 (17), 5364-5372.
- Thorgaard, G.H., 1977. Heteromorphic sex chromosomes in male rainbow trout. *Science*, 196 (4292), 900-902.



Thorgaard, G.H., 1978. Sex chromosomes in the sockeye salmon: a Y-autosome fusion. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 20 (3), 349-354.

Tong, S.K., Chiang, E.F., Hsiao, P.H., Chung, B., 2001. Phylogeny, expression and enzyme activity of zebrafish *cyp19* (P450 aromatase) genes. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 79 (1-5), 299-303.

Tong, S.-K., Chung, B.-c., 2003. Analysis of zebrafish *cyp19* promoters. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 86 (3-5), 381-386.

Trant, J.M., Lehrter, J., Gregory, T., Nunez, S., Wunder, J., 1997. Expression of cytochrome P450 aromatase in the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 61 (3-6), 393-397.

Trant, J.M., Gavasso, S., Ackers, J., Chung, B.C., Place, A.R., 2001. Developmental expression of cytochrome P450 aromatase genes (CYP19a and CYP19b) in zebrafish fry (*Danio rerio*). *Journal of Experimental Zoology*, 290 (5), 475-483.

Trosken, E.R., Scholz, K., Lutz, R.W., Volkel, W., Zarn, J.A., Lutz, W.K., 2004. Comparative assessment of the inhibition of recombinant human CYP19 (aromatase) by azoles used in agriculture and as drugs for humans. *Endocrine Research*, 30 (3), 387-394.

Trudeau, V.L., Lin, H.R., Peter, R.E., 1991. Testosterone potentiates the serum gonadotropin response to gonadotropin-releasing hormone in the common carp (*Cyprinus carpio*) and chinese loach (*Paramisgurnus dabryanus*). *Canadian Journal of Zoology*, 69, 2480-2484.

Trudeau, V.L., Somoza, G.M., Nahorniak, C.S., Peter, R.E., 1992. Interactions of estradiol with gonadotropin-releasing hormone and thyrotropin-releasing hormone in the control of growth hormone secretion in the goldfish. *Neuroendocrinology*, 56 (4), 483-490.

Tyler, C.R., Jobling, S., Sumpter, J.P., 1998. Endocrine disruption in wildlife: a critical review of the evidence. *Critical Reviews in Toxicology*, 28 (4), 319-361.

Uchida, D., Yamashita, M., Kitano, T., Iguchi, T., 2004. An aromatase inhibitor or high water temperature induce oocyte apoptosis and depletion of P450 aromatase activity in the gonads of genetic female zebrafish during sex-reversal. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A : Molecular and Integrative Physiology*, 137 (1), 11-20.

Van den Belt, K., Verheyen, R., Witters, H., 2003. Comparison of vitellogenin responses in zebrafish and rainbow trout following exposure to environmental estrogens. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56 (2), 271-281.

Van den Belt, K., Berckmans, P., Vangenechten, C., Verheyen, R., Witters, H., 2004. Comparative study on the *in vitro/in vivo* estrogenic potencies of 17[ $\beta$ ]-estradiol, estrone, 17[ $\alpha$ ]-ethynylestradiol and nonylphenol. *Aquatic Toxicology*, 66, 183-195.

Vetillard, A., Ferriere, F., Jegou, P., Bailhache, T., 2006. Regulation of salmon gonadotrophin-releasing hormone gene expression by sex steroids in rainbow trout brain. *Journal of Neuroendocrinology*, 18 (6), 445-453.

Villeneuve, D.L., Knoebl, I., Kahl, M.D., Jensen, K.M., Hammermeister, D.E., Greene, K.J., Blake, L.S., Ankley, G.T., 2006. Relationship between brain and ovary aromatase activity and isoform-specific aromatase mRNA expression in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquatic Toxicology*, 76 (3-4), 353-368.

Vinggaard, A.M., Hnida, C., Breinholt, V., Larsen, J.C., 2000. Screening of selected pesticides for inhibition of CYP19 aromatase activity *in vitro*. *Toxicology in Vitro*, 14 (3), 227-234.

Volff, J.N., Schartl, M., 2001. Variability of genetic sex determination in poeciliid fishes. *Genetica*, 111 (1-3), 101-110.

Watanabe, M., Tanaka, M., Kobayashi, D., Yoshiura, Y., Oba, Y., Nagahama, Y., 1999. Medaka (*Oryzias latipes*) FTZ-F1 potentially regulates the transcription of P-450 aromatase in ovarian follicles: cDNA cloning and functional characterization. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 149 (1-2), 221-228.

Watts, M., Pankhurst, N.W., King, H.R., 2004. Maintenance of Atlantic salmon (*Salmo salar*) at elevated temperature inhibits cytochrome P450 aromatase activity in isolated ovarian follicles. *General and Comparative Endocrinology*, 135 (3), 381-390.

Weber, K.S., Setchell, K.D., Lephart, E.D., 2001. Maternal and perinatal brain aromatase: effects of dietary soy phytoestrogens. *Brain Research. Developmental Brain Research*, 126 (2), 217-221.

WHO (World Health Organisation), 2002. IPCS Global Assessment of the States-of-the-Science of Endocrine Disruptors. WHO/PCS/EDC/02.2. International Programme of Chemical Safety, Geneva, Switzerland.

Wong, T.T., Ijiri, S., Zohar, Y., 2006. Molecular Biology of Ovarian Aromatase in Sex Reversal: Complementary DNA and 5'-Flanking Region Isolation and Differential Expression of Ovarian Aromatase in the Gilthead Seabream (*Sparus aurata*). *Biology of Reproduction*,

Yoshiura, Y., Senthilkumaran, B., Watanabe, M., Oba, Y., Kobayashi, T., Nagahama, Y., 2003. Synergistic expression of Ad4BP/SF-1 and cytochrome P-450 aromatase (ovarian type) in the ovary of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, during vitellogenesis suggests transcriptional interaction. *Biology of Reproduction*, 68 (5), 1545-1553.

Yue, W., Brodie, A.M.H., 1997. Mechanisms of the actions of aromatase inhibitors 4-hydroxyandrostenedione, fadrozole, and aminoglutethimide on aromatase in JEG-3 cell culture. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 63 (4-6), 317-328.

Zhao, J., Mak, P., Tchoudakova, A., Callard, G., Chen, S., 2001. Different catalytic properties and inhibitor responses of the Goldfish brain and ovary aromatase isozymes. *General and Comparative Endocrinology*, 123 (2), 180-191.

Zou, J.J., Trudeau, V.L., Cui, Z., Brechin, J., Mackenzie, K., Zhu, Z., Houlihan, D.F., Peter, R.E., 1997. Estradiol Stimulates Growth Hormone Production in Female Goldfish. *General and Comparative Endocrinology*, 106 (1), 102-112.

Zupanc, G., 2006. Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult fish brain. *Journal of Comparative Physiology Part A : Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 192 (6), 649-670.

Zupanc, G.K., 2001. Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the central nervous system of teleost fish. *Brain, Behavior and Evolution*, 58 (5), 250-275.

Zupanc, G.K., Hinsch, K., Gage, F.H., 2005. Proliferation, migration, neuronal differentiation, and long-term survival of new cells in the adult zebrafish brain. *Journal of Comparative Neurology*, 488 (3), 290-319.



# Article 1



# Brain and Gonadal Aromatase as Potential Targets of Endocrine Disrupting Chemicals in a Model Species, the Zebrafish (*Danio rerio*)

N. Hinfray, O. Palluel, C. Turies, C. Cousin, J. M. Porcher, F. Brion

Unité d'évaluation des risques écotoxicologiques, Direction des Risques Chroniques, Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), BP 2, F-60550 Verneuil-en-Halatte, France

Received 17 June 2005; accepted 10 April 2006

**ABSTRACT:** Many chemicals in the aquatic environment are able to adversely affect *in vitro* brain and ovarian aromatase expression/activity. However, it remains to be determined if these substances elicit *in vivo* effect in fish. With the view to further understanding possible effects of endocrine disrupting chemicals (EDCs) on aromatase function, we first developed methods to measure brain and ovarian aromatase expression/activity in a model species, the zebrafish, and assessed the effect of estradiol (E2) and androstatrienedione (ATD), a steroidal aromatase inhibitor. We showed that *CYP19b* gene was predominantly expressed in the brain whereas in the ovary *CYP19a* mRNA level was predominant. Moreover, aromatase activities (AA) were higher in brain than in ovary. In adult zebrafish, E2 treatment had no effect on aromatase expression/activity in brain, whereas at larval stage, E2 strongly triggered *CYP19b* expression. In the ovaries, E2 led to a complete inhibition of both *CYP19a* expression and AA. Exposure to ATD led to a total inhibition of both brain and ovarian AA but had no effect on *CYP19* transcripts abundance. Together, these results provide relevant knowledge concerning the characterization of aromatase in the zebrafish, and reinforce the idea that brain and ovarian aromatase are promising markers of EDCs in fish and deserve further *in vivo* studies. © 2006 Wiley Periodicals, Inc. *Environ Toxicol* 21: 332–337, 2006.

**Keywords:** zebrafish; aromatase; brain; gonad; biomarker

## INTRODUCTION

To date, most attention on endocrine disrupting chemicals (EDCs) has been focused on compounds that interact with the estrogen receptor (ER). However, the endocrine system may also be disrupted by environmental substances through pathways and mechanisms others than those ER-mediated. Function of the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis can be affected by xenobiotics that affect metabolism of

sex steroid hormones. In this regard the biosynthesis of steroid hormones provides enzymatic targets for EDCs, particularly the steps catalyzed by cytochrome P450-dependent enzymes (Sanderson and Van den Berg, 2003). Among these enzymes, cytochrome P450 aromatase (*CYP19*) is a crucial steroidogenic enzyme catalyzing the final, rate-limiting step in the conversion of androgens into estrogens (Simpson et al., 1994). Recent studies reported alteration of steroidogenesis associated with adverse reproductive effects in wild fish collected from contaminated sites (Noaks-son et al., 2001; Orlando et al., 2002; Lavado et al., 2004). However the nature (and the levels) of substances involved in these biological responses remains to be determined. In the laboratory, different substances from diverse chemical family have been shown to disrupt aromatase (Monod et al., 1993; Monteiro et al., 2000; Sanderson et al., 2002). In fish, however, most of the data were obtained from

Correspondence to: F. Brion; e-mail: Francois.Brion@ineris.fr

Contract grant sponsor: French Ministry of Ecology and Sustainable Development (Budget Civil de Recherche et Développement, BCRD).

Contract grant number: AP17-02.

Contract grant sponsor: INERIS and ARNT (National Association for Technical Research).

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI 10.1002/tox.20203

© 2006 Wiley Periodicals, Inc.

*in vitro* studies and little is known about their *in vivo* effects.

The purpose of this study was to assess the effect of the natural steroidal estrogen, estradiol (E2), product of the aromatization reaction, and androstratienedione (ATD), a steroidal aromatase inhibitor, on aromatase expression and activities in the zebrafish (*Danio rerio*). The zebrafish is a prominent vertebrate model in a variety of biological disciplines (Hill et al., 2005) and is extensively used for assessing the effects of estrogenic compounds at various biological levels of organization (Brion et al., 2002, 2004; Fenske and Segner, 2004; Nash et al., 2004). In the zebrafish, two distinct aromatase genes have been isolated (*CYP19a* and *CYP19b*) and their 5'-flanking region characterized (Kazeto et al., 2001). While their tissue and ontogenic expression profiles are relatively well described (Trant et al., 2001), data on brain and ovarian aromatase activities (AA) in control and exposed zebrafish are missing. With the view to further understanding possible effects of EDCs on aromatase function, detailed information on gene expression and enzyme activities in both the gonads and brain are needed and this was the first aim of this study.

## MATERIALS AND METHODS

### Fish Exposure to E2 and ATD

Wild type zebrafish (*Danio rerio*) were obtained from our breeding unit. Female zebrafish were exposed for 7 days to 17- $\beta$ -estradiol (E2, 10 nM), 1,4,6-androstatrien-3,17-dione (ATD, 1  $\mu$ M), or solvent (DMSO). Exposures were realized under semistatic conditions with a total renewal of the water every day. Each substance was tested in duplicate separated tanks. One replicate was used to measure aromatase activity ( $N = 10$  fish), and the other one to measure *CYP19* mRNA levels ( $N = 7$  fish).

Zebrafish larvae of 17 days post-fertilization (dpf) were exposed to either E2 (10 nM) alone or in combination with ICI 182-780 (Tocris, Bristol, UK) or to solvent alone (DMSO) for 72 h. Each experimental group was constituted of 20 zebrafish larvae exposed in 100 mL of water. One half of the water was renewed every day.

### Fish Dissection and Tissue Sampling

Adult fish were euthanized by an overdose of MS-222, measured and weighted. Brain and gonads were removed, weighted, and the gonado somatic index (GSI) was calculated.

Tissues (or larvae) used for subsequent determination of mRNA levels were immediately stored at 4°C in a solution of RNeasy<sup>TM</sup> (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France). Samples were kept at 4°C overnight and conserved at -20°C until measurement. For AA measurement, tissues were rinsed in ice-cold KCl (0.15 M) and homogenized in a 50 mM potassium phosphate buffer, (pH 7.4) containing 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, and 20% glycerol (v/v) in a ratio

of 1:2 (w/v). S9 fractions were isolated by centrifugation of the homogenates (10,000g, 15 min, 4°C). For the brains, S9 were aliquoted and stored at -80°C until use while for the ovaries supernatants were subsequently ultra-centrifuged at 100,000g (90 min, 4°C). AA were measured in ovarian microsomes instead of S9 fractions to avoid variation of protein content during the reproductive cycle which may lead to incorrect measurement of AA in this tissue. The microsomal pellets were resuspended in the same buffer as used for the homogenization. The total amount of proteins was determined by the method of Bradford with BSA (bovine serum albumin, Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France) as standard (Bradford, 1976).

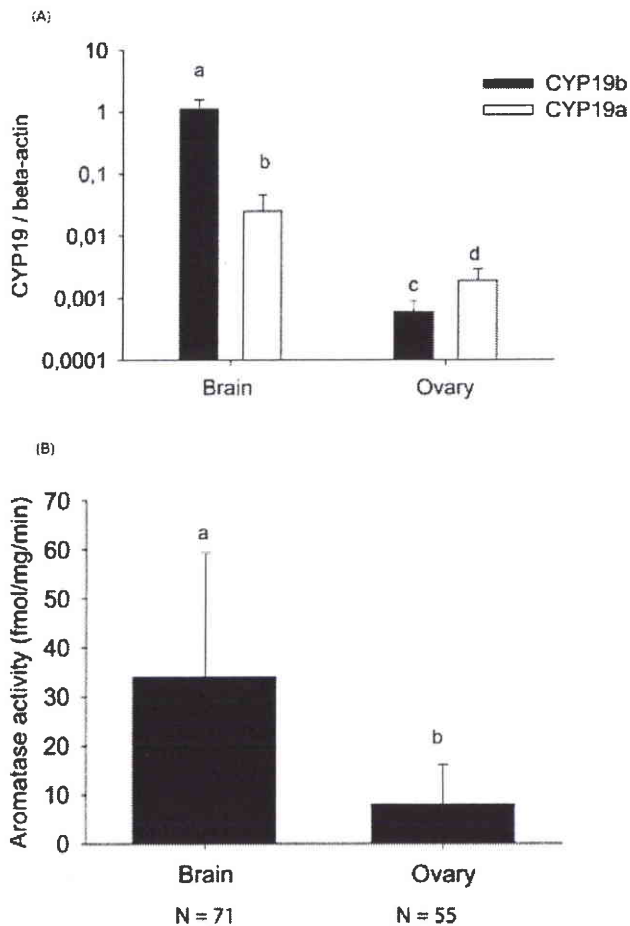
### Determination of *CYP19a* and *CYP19b* mRNA Levels

*CYP19* mRNA levels were measured by a branched DNA assay (QuantiGene, Genospectra, Fremont, CA, USA). It directly measures RNA and does not require reverse transcription and cDNA amplification. The bDNA assays were performed according to the manufacturer instructions. Tissues (or 10 pooled whole-body zebrafish larvae) were lysed and incubated in a 96-well plate coated with synthetic oligonucleotide in the presence of a specific probe set designed according to the *CYP19a* and *CYP19b* mRNA sequences (gene bank accession number AF183906 and AF183908 respectively). Capture probe allowed capture of the target mRNA to the synthetic oligonucleotide. Blocking probe linearized the target mRNA and a label probe hybridized to the target mRNA and to a branched DNA (bDNA) coupled with alkaline-phosphatase-bound probes. Addition of a chemiluminescence substrate (dioxetan) yields a luminescence signal that is proportional to the amount of mRNA present in the sample. Quantification of luminescence was made on a microplate luminometer (Wallac Victor<sup>2</sup>, Perkin Elmer, Courteboeuf, France). *CYP19* expression values were normalized to a housekeeping gene, *zf*  $\beta$ -actin (gene bank accession number NM 131031). Measurement of target and housekeeping genes were realized in duplicate.

### Aromatase Assay

Brain and ovarian AA were measured in individual fish by the tritiated water assay modified from Thompson and Siiteri (1974). The following additions were made in a final volume of 500  $\mu$ L: 200  $\mu$ g of microsomal proteins (ovary) or S9 fraction proteins (brain), 20  $\mu$ M of NADPH, 1 mM NADP, 10 mM G6P, 2 U/mL of G6PDH, 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4. The mixture was preincubated at 27°C for 10 min, and the reaction started with the addition of 150 nM [ $^3$ H]androst-4-ene-3,17-dione (Perkin Elmer, Courteboeuf, France). The reaction was stopped after 1 h of incubation by adding 1 mL of chloroform. The aqueous layer was extracted twice with chloroform and once with charcoal (5%, w/v). Aqueous phase (150  $\mu$ L) was mixed with 750  $\mu$ L of





**Fig. 1.** Relative transcript abundance of *CYP19a* and *CYP19b* gene (normalized to  $\beta$ -actin transcript abundance in the same samples) (A) and aromatase activity (B) measured in brain and ovary of adult female zebrafish. Results are expressed as mean and SD. Different letters indicate statistically different values (student's *t*-test,  $P < 0.05$ ).

OptiPhase "Hi safe" 3 (Perkin Elmer, Courteboeuf, France) before scintillation counting (Microbeta, Perkin Elmer, Courteboeuf, France). AA measurements were realized in duplicates. Results were expressed in fmol/mg/min.

### Data Analysis and Statistics

Differences between groups were analyzed for statistical significance with the Student's *t*-test. Results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation, and differences between groups were considered to be significant if  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### Baseline Aromatase Expression and Activity in Adult Female Zebrafish

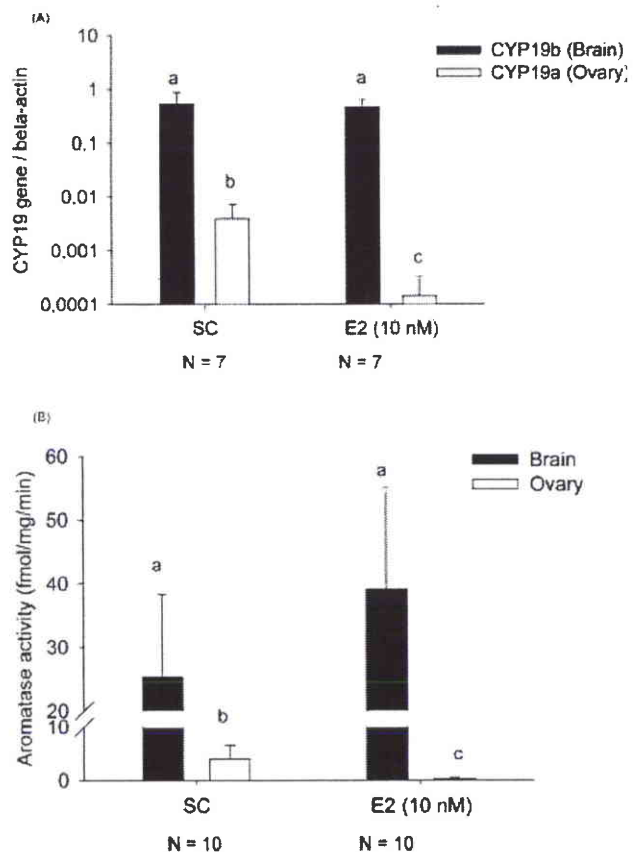
The transcript abundance for *CYP19a* and *CYP19b* genes is shown in Figure 1(A). In the brain, levels of *CYP19b*

mRNA expression was about 45-fold higher than *CYP19a* expression, while, in the ovaries, levels of *CYP19a* mRNA expression was about threefold higher than *CYP19b* expression. Moreover, the level of expression of *CYP19b* was higher in the brain than the expression of *CYP19a* in the ovary. At enzymatic level, AA measured in female zebrafish by the tritiated water assay were higher in brain than in ovaries [Fig. 1(B)]. There was about a fourfold difference between brain and ovarian AA ( $34.0 \pm 25.3$  and  $8.1 \pm 8.2$  fmol/mg/min respectively).

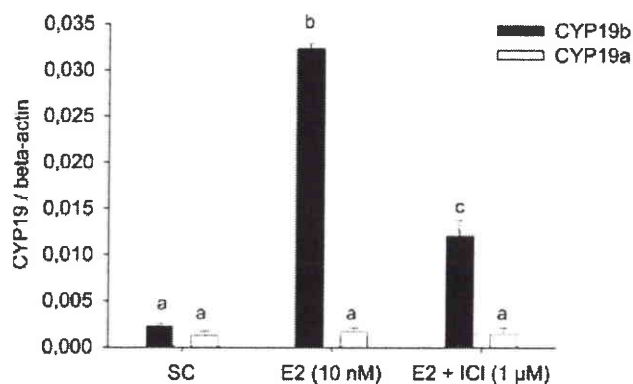
### Effect of Exposure to E2 and ATD

In adult female zebrafish, E2 exposure had no effect on *CYP19b* expression in the brain but significantly inhibited *CYP19a* expression in the ovary [Fig. 2(A)]. At enzymatic level, brain AA were not affected, but ovarian AA were totally inhibited [Fig. 2(B)].

In zebrafish larvae exposed between 17 and 20 dpf to E2, there was no significant effect on *CYP19a* expression.



**Fig. 2.** Effect of E2 on *CYP19a* and *CYP19b* expression in ovary and brain respectively (A) and on aromatase activity (B). Results are expressed as mean and SD. SC = solvent control. Different letters indicate statistically different values (student's *t*-test,  $P < 0.05$ ).



**Fig. 3.** Effect of E2 alone or in combination with ICI 182-780 on *CYP19a* and *CYP19b* transcript abundance in zebrafish larvae after a 72-h *in vivo* exposure between 17 and 20 dpf. SC = solvent control.  $N = 2$  replicate for each group tested (one replicate corresponds to 10 larvae). Different letters indicate statistically different values (student's *t*-test,  $P < 0.05$ ).

However, a 16-fold increase in *CYP19b* expression was measured (Fig. 3). In addition, cotreatment with the pure antagonist of the ER receptor ICI 182-780 led to a significant inhibition of the E2-induced *CYP19b* mRNA levels.

In ATD-exposed fish, there was no significant effect neither on the transcript abundance of *CYP19b* gene in the brain nor on *CYP19a* expression in the ovary [Fig. 4(A)]. However, it totally inhibited both brain and ovarian AA [Fig. 4(B)].

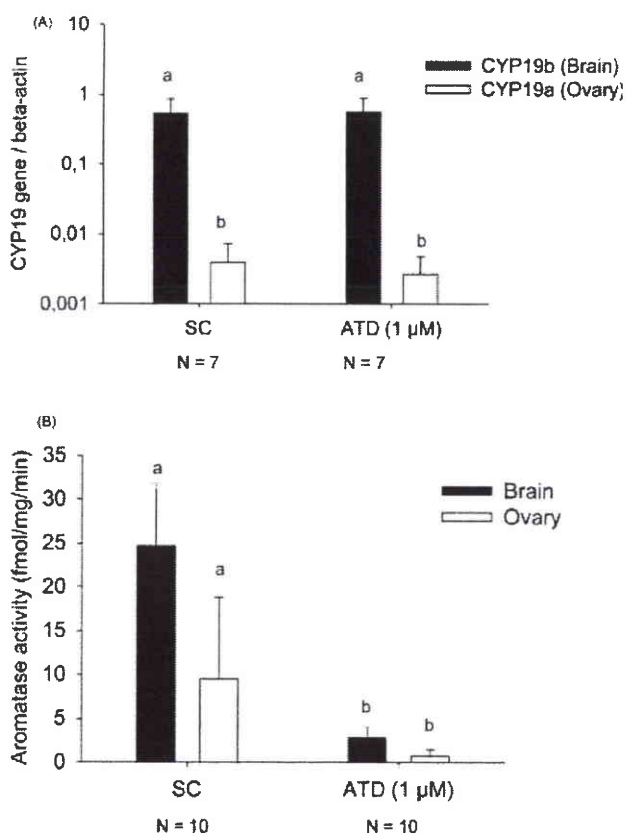
## DISCUSSION

### *CYP19* Genes Expression and AA in Adult Female Zebrafish

In contrast to mammals, many teleosts fish possess two forms of the aromatase gene in their genome, as it was demonstrated for zebrafish (Kishida and Callard, 2001). *CYP19a* and *CYP19b* transcripts, as measured by the bDNA assays, were both detected in ovarian and brain tissues of adult female zebrafish which is in agreement with previously reported *CYP19* genes expression measured by RT-PCR (Trant et al., 2001; Fenske and Segner, 2004). In the ovary, *CYP19a* mRNA level was higher compared with *CYP19b*, whereas *CYP19b* expression was predominant in the brain. Cerebral *CYP19b* was shown to be expressed at particularly high levels in adult female (about 600-fold *CYP19a* expression in the ovary), which is well in accordance with the difference observed by Trant et al. (2001). At the cellular level, ovarian *CYP19a* expression was localized in granulosa cells surrounding follicles (Goto-Kazeto et al., 2004); in the brain, aromatase B was found to be expressed exclusively in radial glial cells at high levels in males and females (Menuet et al., 2005). Teleosts fish are well known for their exceptionally high cerebral levels of aromatase (Pasmanik and Callard,

1988; Callard et al., 2001). However, the functional outcomes of elevated aromatase expression in the brain of teleosts fish are still unresolved. Since teleosts fish shows a continuous neurogenesis throughout life, one hypothesis is that the high levels of neuroestrogens synthesis in adult may be related to the remarkable neuroplasticity and regenerative potential of the adult fish central nervous system (Callard et al., 2001; Forlano et al., 2001).

Further characterization was achieved by measuring brain and ovarian AA in female zebrafish. In agreement with the abundance of *CYP19a* and *CYP19b* transcripts, we showed that brain AA were significantly higher than ovarian AA, which is in accordance with the general pattern of AA described in other teleosts fish (Pasmanik and Callard, 1988; Gonzalez and Piferrer, 2002). These differences can be accounted for differences in the levels of mRNA expression in the two tissues (Trant et al., 2001; our study) and could be due to the higher catalytic activity ( $V_{max}$ ) of the brain aromatase compared with that of the ovarian aromatase (data not shown).



**Fig. 4.** Effect of ATD on *CYP19a* and *CYP19b* transcript abundance in ovary and brain respectively (A) and on aromatase activity (B). Results are expressed as mean and SD. SC = solvent control. Different letters indicate statistically different values (student's *t*-test,  $P < 0.05$ ).

### Effect of Exposure of Zebrafish to E2 and ATD on CYP19 Expression and AA

At adult stage, E2 had no significant effect on *CYP19b* expression and AA in the brain of female zebrafish. In contrast, short-term exposure of zebrafish larvae to E2 strongly up-regulated *CYP19b* expression. This result confirms previous data obtained by RT-PCR on RNA from total zebrafish embryos and larvae exposed to E2 (Kishida and Callard, 2001). *In toto* hybridization and immunohistochemistry experiments further revealed that E2 causes strong expression of AroB messengers and proteins in radial glial cells of zebrafish embryos and larvae (Menuet et al., 2005). Additionally, the E2-dependent induction of the *CYP19b* gene was blocked by cotreatment with an excess of the pure ER antagonist ICI 182-780, indicating that functional ERs were involved. In teleosts fish brain, *CYP19b* gene is known to be under the control of a positive autoregulatory feedback loop driven by E2, the product of aromatization (Callard et al., 2001). On a molecular basis, it was recently demonstrated that the E2-dependent regulation involves a direct transcriptional action of ERs requiring the synergistic effect of ERE and ½ ERE in the promoter region of the *CYP19b* gene (Menuet et al., 2005). The absence of effect of E2 on aromatase in adult zebrafish brain is not surprising, since the endogenous estrogenic stimulation on aromatase expression/activities is already high because of the positive autoregulatory feedback loop driven by E2 (Callard et al., 2001). Our results clearly demonstrated that the AroB expression is very sensitive to (xeno)-estrogen in zebrafish larvae in comparison with that in adult fish and reinforce the idea that AroB is a promising marker of estrogenic compounds in zebrafish early life stages (Menuet et al., 2005). In contrast to the dramatic alteration of the *CYP19b* gene expression, E2 had no effect on *CYP19a* expression in zebrafish larvae. In zebrafish fry exposed to high concentration of EE2, conflicting results were obtained, since RT-PCR analysis revealed no effect or down-regulation of the *CYP19a* gene (Trant et al., 2001; Kazeto et al., 2004). At adult stage, both *CYP19a* expression and AA were totally inhibited in the ovary of E2-exposed fish and our results suggest that the inhibitory effect of E2 on AA in ovary of mature female is mediated through a transcriptional inhibition of the *CYP19a* gene. However, the exact mechanism of action of E2 on *CYP19a* expression remains to be determined. It may be attributed to a negative feedback action of E2 on gonadotropins release, which are known to stimulate aromatase gene expression and activities in ovarian follicles (Gen et al., 2001; Kagawa et al., 2003). However, a direct effect of E2 on the ovary cannot be excluded. Indeed, it has been demonstrated that the inhibitory effect of E2 on steroidogenic enzymes' mRNA levels in undifferentiated testis of rainbow trout did not imply follicle stimulating hormone (Baron et al., 2005). The absence of ERE in the promoter region of

*CYP19a* gene does not support an ER-mediated effect. It is interesting to note that similar concentration of E2 leads to an alteration of oogenesis in females, the ovaries of exposed fish being composed mainly of immature oocytes (Brion et al., 2000). It can be suggested that the effects seen at histological level are mediated, at least in part, by inhibition of ovarian aromatase.

Exposure of female zebrafish to the steroidal aromatase inhibitor ATD resulted in dramatic inhibition of AA in both brain and ovary. ATD is known to inhibit vertebrate aromatase by binding irreversibly to the active site of the enzyme (Yue and Brodie, 1997). We previously showed that ATD exhibited a high efficiency at inhibiting *in vitro* brain and ovarian microsomal AA in rainbow trout (Hinfray et al., 2004). The *in vivo* effects of ATD on AA are thus consistent with the *in vitro* inhibitory effect of this molecule. In contrast to the effect seen at the enzymatic level, exposure to ATD had no effect neither on the transcriptional activity of the *CYP19b* gene nor on the *CYP19a* gene. As previously stated, *CYP19b* transcription in fish brain is up-regulated by E2 through a positive feedback loop (Callard et al., 2001). Thus, it could be expected that the local deprivation of E2 due to aromatase inhibition in the brain could lead to a decreasing transcript abundance of the *CYP19b* gene. The absence of effect might be due to the short-term exposure duration of fish to ATD and it is likely that a prolonged exposure time would result in a significant effect, as shown in letrozole-exposed zebrafish larvae for 30 days (Kazeto et al., 2004).

### CONCLUSION

This study provides relevant data on aromatase expression at the gene and enzymatic levels in brain and in ovary of adult female fish. We showed that *CYP19b* expression was predominant in brain whereas *CYP19a* expression was predominant in ovary and that AA were higher in brain than in ovary. Our results indicate that E2 and ATD exposures deeply affect aromatase expression and activities in the zebrafish. The observed effects were dependent on the sub-cellular level at which aromatase function was assessed (gene expression, AA), the target tissue (brain, ovary), and the life stage of development (larvae, adult). From these results it appears that measurements of both *CYP19* genes expression and AA in the zebrafish are relevant and promising molecular and biochemical markers of EDCs in fish.

### REFERENCES

- Baron D, Fostier A, Breton B, Guiguen Y. 2005. Androgen and estrogen treatments alter steady state messengers RNA (mRNA) levels of testicular steroidogenic enzymes in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Mol Reprod Dev* 71:471-479.

- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254.
- Brion F, Triffault G, Palazzi X, Forraz M, Garric J, Migeon B, Noury P, Porcher JM, Thybaud E, Tyler CR, Flammarion P. 2000. Effect of estradiol on vitellogenesis and reproductive parameters in zebrafish (*Danio rerio*). In: Proceedings of the Third World Congress of the SETAC, Brighton, UK, 21–25 May.
- Brion F, Nilsen BM, Eidem JK, Goksoyr A, Porcher JM. 2002. Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Toxicol Chem* 21:1699–1708.
- Brion F, Tyler CR, Palazzi X, Laillet B, Porcher JM, Garric J, Flammarion P. 2004. Impacts of 17[ $\beta$ ]-estradiol, including environmentally relevant concentrations, on reproduction after exposure during embryo-larval-, juvenile- and adult-life stages in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol* 68:193–217.
- Callard GV, Tchoudakova AV, Kishida M, Wood E. 2001. Differential tissue distribution, developmental programming, estrogen regulation and promoter characteristics of *cyp19* genes in teleost fish. *J Steroid Biochem Mol Biol* 79:305–314.
- Fenske M, Segner H. 2004. Aromatase modulation alters gonadal differentiation in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol* 67:105–126.
- Forlano PM, Deitcher DL, Myers DA, Bass AH. 2001. Anatomical distribution and cellular basis for high levels of aromatase activity in the brain of teleost fish: Aromatase enzyme and mRNA expression identify glia as source. *J Neurosci* 21:8943–8955.
- Gen K, Okuzawa K, Kumakura N, Yamaguchi S, Kagawa H. 2001. Correlation between messenger RNA expression of cytochrome P450 aromatase and its enzyme activity during oocyte development in the red seabream (*Pagrus major*). *Biol Reprod* 65:1186–1194.
- Gonzalez A, Piferrer F. 2002. Characterization of aromatase activity in the sea bass: Effects of temperature and different catalytic properties of brain and ovarian homogenates and microsomes. *J Exp Zool* 293:500–510.
- Goto-Kazeto R, Kight KE, Zohar Y, Place AR, Trant JM. 2004. Localization and expression of aromatase mRNA in adult zebrafish. *Gen Comp Endocrinol* 139:72–84.
- Hill AJ, Teraoka H, Heideman W, Peterson RE. 2005. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicol Sci* 86:6–19.
- Hinfray N, Porcher JM, Brion F. 2004. In vitro effect of various environmental pollutants on brain and ovarian aromatase activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). In: Proceedings of the 14th Congress of the SETAC Europe, Prague, Czech Republic, 18–22 April.
- Kagawa H, Gen K, Okuzawa K, Tanaka H. 2003. Effects of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor-I on aromatase activity and P450 aromatase gene expression in the ovarian follicles of red seabream, *Pagrus major*. *Biol Reprod* 68:1562–1568.
- Kazeto Y, Ijiri S, Place AR, Zohar Y, Trant JM. 2001. The 5'-flanking regions of *CYP19A1* and *CYP19A2* in zebrafish. *Biochem Biophys Res Commun* 288:503–508.
- Kazeto Y, Place AR, Trant JM. 2004. Effects of endocrine disrupting chemicals on the expression of *CYP19* genes in zebrafish (*Danio rerio*) juveniles. *Aquat Toxicol* 69:25–34.
- Kishida M, Callard GV. 2001. Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in zebrafish (*Danio rerio*) brain and ovary are differentially programmed and estrogen regulated during early development. *Endocrinology* 142:740–750.
- Lavado R, Thibaut R, Raldua D, Martin R, Porte C. 2004. First evidence of endocrine disruption in feral carp from the Ebro River. *Toxicol Appl Pharmacol* 196:247–257.
- Menuet A, Pellegrini E, Brion F, Gueguen MM, Anglade I, Pakdel F, Kah O. 2005. Expression and estrogen-dependent regulation of the zebrafish brain aromatase gene. *J Comp Neurol* 485:304–320.
- Monod G, De Mones A, Fostier A. 1993. Inhibition of ovarian microsomal aromatase and follicular estradiol suppression by imidazole fungicides in rainbow trout. *Mar Environ Res* 35:153–157.
- Monteiro PRR, Reis-Henriques MA, Coimbra J. 2000. Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit in vitro ovarian steroidogenesis in the flounder (*Platichthys flesus L.*). *Aquat Toxicol* 48:549–559.
- Nash JP, Kime DE, Van der Ven LT, Wester PW, Brion F, Maack G, Stahlschmidt-Allner P, Tyler CR. 2004. Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethynylestradiol causes reproductive failure in fish. *Environ Health Perspect* 112:1725–1733.
- Noaksson E, Tjarnlund U, Bosveld ATC, Balk L. 2001. Evidence for endocrine disruption in perch (*Perca fluviatilis*) and roach (*Rutilus rutilus*) in a remote swedish lake in the vicinity of a public refuse dump. *Toxicol Appl Pharmacol* 174:160–176.
- Orlando EF, Davis WP, Guillette LJ Jr. 2002. Aromatase activity in the ovary and brain of the eastern mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) exposed to paper mill effluent. *Environ Health Perspect* 110(Suppl 3):S429–S433.
- Pasmanik M, Callard GV. 1988. Changes in brain aromatase and 5  $\alpha$ -reductase activities correlate significantly with seasonal reproductive cycles in goldfish (*Carassius auratus*). *Endocrinology* 122:1349–1356.
- Sanderson JT, Boerma J, Lansbergen GWA, van den Berg M. 2002. Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma Cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 182:44–54.
- Sanderson JT, van den Berg M. 2003. Interactions of xenobiotics with the steroid hormone biosynthesis pathway. *Pure Appl Chem* 75:1957–1971.
- Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, Amameh B, Ito Y, Fisher CR, Michael MD. 1994. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev* 15:342–355.
- Thompson EA Jr, Siiteri PK. 1974. Utilization of oxygen and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate by human placental microsomes during aromatization of androstenedione. *J Biol Chem* 249:5364–5372.
- Trant JM, Gavasso S, Ackers J, Chung BC, Place AR. 2001. Developmental expression of cytochrome P450 aromatase genes (*CYP19a* and *CYP19b*) in zebrafish fry (*Danio rerio*). *J Exp Zool* 290:475–483.
- Yue W, Brodie AMH. 1997. Mechanisms of the actions of aromatase inhibitors 4-hydroxyandrostenedione, fadrozole, and aminoglutethimide on aromatase in JEG-3 cell culture. *J Steroid Biochem Mol Biol* 63:317–328.

## **Article 2**





ELSEVIER

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

Comparative Biochemistry and Physiology, Part C xx (2006) xxx – xxx

[www.elsevier.com/locate/cbpc](http://www.elsevier.com/locate/cbpc)

## Inhibition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) P450 aromatase activities in brain and ovarian microsomes by various environmental substances

Nathalie Hinfray, Jean-Marc Porcher, François Brion\*

Unité d'évaluation des risques écotoxicologiques, Direction des Risques Chroniques, Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), BP 2, F-60550 Verneuil-en-Halatte, France

Received 20 April 2006; received in revised form 16 September 2006; accepted 16 September 2006

### Abstract

Aromatase, a key steroidogenic enzyme that catalyses the conversion of androgens to estrogens, represent a target for endocrine disrupting chemicals. However, little is known about the effect of pollutants on aromatase enzymes in fish. In this study, we first optimized a rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) microsomal aromatase assay to measure the effects of 43 substances belonging to diverse chemical classes (steroidal and non steroidal aromatase inhibitors, pesticides, heavy metals, organotin compounds, dioxins, polycyclic aromatic hydrocarbons) on brain and ovarian aromatase activities *in vitro*. Our results showed that 12 compounds were able to inhibit brain and ovarian aromatase activities in a dose-dependent manner with IC<sub>50</sub> values ranging from the low nM to the high μM range depending on the substance: steroidal and non steroidal inhibitors of aromatase (4-hydroxyandrostenedione, androstatrienedione, aminogluthethimide), imidazole fungicides (clotrimazole, imazalil, prochloraz), triazole fungicides (difenoconazole, fenbuconazole, propiconazole, triadimenol), the pyrimidine fungicide fenarimol and methylmercury. Overall, this study demonstrates that rainbow trout brain and ovarian microsomal aromatase assay is suitable for evaluating potential aromatase inhibitors *in vitro* notably with respect to environmental screening. The results highlight that methylmercury and some pesticides that are currently used throughout the world, have the potential to interfere with the biosynthesis of endogenous estrogens in fish.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Aromatase; Brain; Ovary; Endocrine disrupting chemicals; Rainbow trout; Tritiated water assay

### 1. Introduction

It has now been well established that many environmental pollutants are able to disturb the normal physiology and endocrinology of organisms. These substances, termed Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs), have been defined as “exogenous substances that cause adverse health effects in an intact organism, or its progeny, secondary to changes in endocrine function” (OECD, 1997). Exposure of fish to EDCs has been associated with reproductive adverse effects at both individual and population level in a variety of fish species

(Jobling et al., 2002; Brion et al., 2004; Nash et al., 2004; Mills and Chichester, 2005). These substances have multiple modes of action since they can potentially act on the synthesis, secretion, transport, action and elimination of endogenous hormones (Segner et al., 2003). To date, research has focused mainly on compounds that interfere with sex steroids receptors, particularly the estrogen receptor. However, the endocrine system may also be disrupted by environmental substances through pathways and mechanisms other than those that are ER-mediated. The knowledge of critical molecular and biochemical targets of EDCs in fish is thus of a great interest.

The biosynthesis of steroid hormones represents a target for EDC action, particularly the steps catalysed by cytochrome P450-dependent enzymes (Monod et al., 1993). In vertebrates, an essential sex-related enzyme is aromatase (P450aro). Aromatase is an enzymatic complex including a NADPH-dependent cytochrome P450 reductase and a cytochrome P450

\* Corresponding author. Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), Direction des Risques Chroniques, Unité d'évaluation des risques écotoxicologiques, BP 2, F-60550 Verneuil-en-Halatte, France. Tel.: +33 3 44 55 65 12; fax: +33 3 44 55 67 67.

E-mail address: [Francois.Brion@ineris.fr](mailto:Francois.Brion@ineris.fr) (F. Brion).

aromatase which catalyzes the final, rate-limiting step in the conversion of androgens into estrogens (Simpson et al., 1994). In fish, this enzyme has been shown to be mainly expressed in ovary and brain. In mammals except pig, only one gene encodes the aromatase while in several teleost fish such as zebrafish (*Danio rerio*), goldfish (*Carassius auratus*) or rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), aromatase is encoded by two different genes: *cyp19a* (or *cyp19A1*) and *cyp19b* (*cyp19A2*) (Callard and Tchoudakova, 1997; Kishida and Callard, 2001; Dalla Valle et al., 2002). These two distinct genes generate two structurally and functionally different aromatase proteins, CYP19A1 or P450 Aro A (AroA), and CYP19A2 or P450 Aro B (AroB) (Tchoudakova and Callard, 1998; Chiang et al., 2001a; Blazquez and Piferrer, 2004). These genes have distinct expression patterns: the brain aromatase activity is mainly due to the expression of the *cyp19b* gene while the ovarian aromatase activity is mainly due to the expression of the *cyp19a* gene (Tchoudakova and Callard, 1998; Chiang et al., 2001b; Forlano et al., 2001; Kishida and Callard, 2001; Trant et al., 2001; Dalla Valle et al., 2002; Menuet et al., 2005).

In teleostean fish, brain aromatase activity is much higher than in mammals (Pasmanik and Callard, 1985, 1988). This very high expression of brain aromatase could be linked to the capability of fish brain to grow during adulthood (Gelinas et al., 1998; Forlano et al., 2001). In the gonads, transcription of the aromatase gene has been proposed as a key step in the process of ovarian differentiation. For instance, in the rainbow trout (*O. mykiss*), inhibition of ovarian aromatase in undifferentiated female resulted in a complete masculinization of an all-female population (Guiguen et al., 1999). Moreover, during the female reproductive cycle, ovarian secretion of 17 $\beta$ -estradiol controls the hepatic synthesis of vitellogenin, a phospho-lipoprotein corresponding to the major precursor of embryonic trophic reserves (Flouriot et al., 1997).

Recent studies have reported alterations of brain and/or ovarian P450 aromatase activities in wild fish collected from contaminated sites (Noaksson et al., 2001, 2003; Orlando et al., 2002; Lavado et al., 2004) suggesting that fish populations are exposed to substances that perturb the biosynthesis of estrogens. However the nature (and the levels) of substances involved in these biological responses remains to be determined. In fish, a few studies have shown that environmental chemicals can interfere with aromatase activity. In these studies, the range of substances was limited to some pesticides (Monod et al., 1993; Noaksson et al., 2003; Ankley et al., 2005) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) (Monteiro et al., 2000). Thus, there is a need to provide a broader, more systematic knowledge on aromatase inhibiting potencies of environmental chemicals. Further, most of the available studies have analysed only gonadal aromatase and it remains to be determined whether the brain form is likewise affected.

Considering the critical role of aromatase in development and reproduction in fish as well as the large number of chemical substances that can potentially affect this enzyme, the aim of this study was to investigate whether several substances belonging to diverse chemical classes (pesticides, polycyclic aromatic hydrocarbon, heavy metals) affect brain and ovarian aromatase activities in rainbow trout (*O. mykiss*) *in vitro*. For this purpose,

we first optimized a microsomal aromatase assay to measure the effect of xenobiotics on aromatase activity in fish.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents and chemicals

[1 $\beta$ -3H (*N*)]androst-4-ene-3,17-dione (specific activity 25.3 Ci/mmol) was purchased from Perkin Elmer (France). Glucose-6-phosphate dehydrogenase was obtained from Fluka (France).  $\beta$ -NADPH tetrasodium salt,  $\beta$ -NADP sodium salt, glucose-6-phosphate dipotassium salt were purchased from Sigma–Aldrich (France). Diuron, heavy metals (triphenylarsine, cadmium chloride, and methyl mercury), PAHs (Benzo[*a*]pyrene (B[*a*]P) and chrysene), pentachlorophenol, 4-hydroxyandrostenedione, aminoglutethimide and clotrimazole were purchased from Sigma–Aldrich (France). Aldrin, alpha-cypermethrin, amitrol, atrazine, benomyl, bupirimate, chlordane, difenoconazole, endosulfan, fenarimol, fenbuconazole, fipronil, heptachlor, imazalil, iprodion, isoproturon, mecoprop, methoxychlor, metolachlor, parathion-methyl, permethrin, prochloraz, propiconazole, simazine, triadimenol, trifluralin, and vinclozolin comes from Riedel-de-Haën (France). Tri-*n*-butyltin chloride (TBT) was obtained from Acros Organics (France). 2,3,7,8 TCDD was obtained from Promochem (France), lead acetate was obtained from Rectapur (France) and 1,4,6-androstatrien-3,17-dione was obtained from Steraloids (USA). Azimsulfuron comes from Du Pont (France), and oxadiazon from Supelco (France). Reagents and chemicals were of the highest purity.

### 2.2. Origin of fish, fish maintenance and dissections

Female rainbow trout (*O. mykiss*) were obtained from two experimental fish farms (INRA, Gournay-sur-Aronde, France and INRA, Jouy-en-Josas, France). The fish were maintained in the laboratory under a natural photoperiod in 500 litre tanks supplied with dechlorinated tap water (temperature 15.5 $\pm$ 1.3 °C, pH 8.06 $\pm$ 0.18, dissolved oxygen 8.80 $\pm$ 0.18 mg/L, conductivity 667.0 $\pm$ 6.5  $\mu$ S/cm), and were fed twice a week with granules NEO prima 5 (Le gouessant aquaculture, France). Fish were killed by cranial blow, then measured and weighed. The brain and the ovaries were removed and the gonads weighed to determine the gonado-somatic index (GSI). After removal, tissues were rinsed in ice cold KCl (0.15 M). In order to obtain sufficient material for preparation of brain and gonad microsomes, brains or ovaries of fish were pooled according to their GSI and different batches of brain and ovarian microsomes were constituted such as follows: for each tissue, 4 batches of microsomes were obtained from females with GSI < 1% ("low GSI", *N*=12 fish/batch), 2 other batches were obtained from females having GSI comprised between 8% and 13% ("medium GSI", *N*=13 fish/batch) and 2 batches were obtained from females having GSI > 13% ("high GSI", *N*=17 fish/batch).

### 2.3. Preparation of brain and ovarian microsomes

Pooled brain or gonad tissues were homogenized with a Teflon potter homogenizer in a 50 mM potassium phosphate



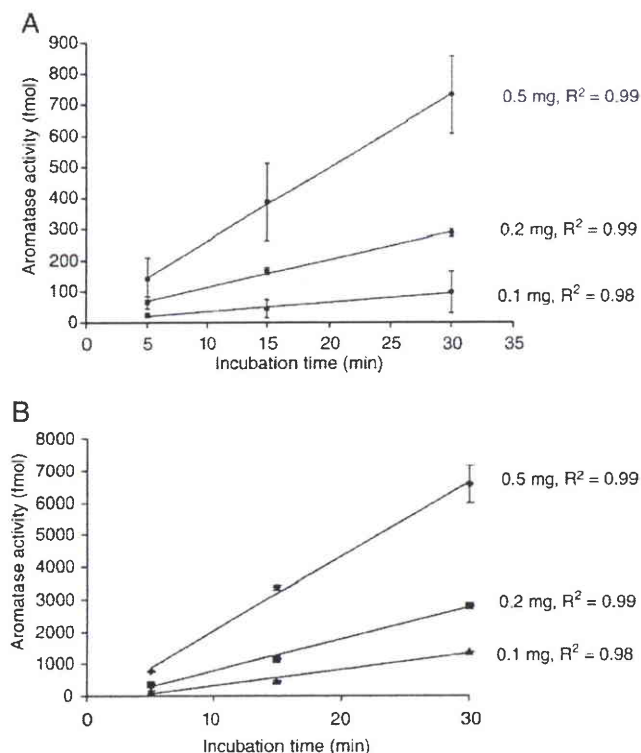


Fig. 1. Effect of the amount of microsomal proteins and incubation time on the aromatase activities (AA) in rainbow trout ovaries (A) and brain (B). In all experiments, the concentration of substrate was 75 nM and the reaction was carried out at a temperature of 27 °C. Each value represents the mean of two independent experiments  $\pm$  SD.

buffer, pH 7.4, containing 1 mM PMSF, 1 mM EDTA and 20% glycerol (v/v) in a ratio of 1:2 (w:v). After centrifugation of the homogenates (10,000 g, 20 min, 4 °C), the supernatants were collected and centrifuged at 100,000 g (90 min, 4 °C). The microsomal pellet was then resuspended in the same buffer as used for the homogenization (100  $\mu$ L/fish) and the total amount of microsomal protein determined (Bradford, 1976) using BSA (bovine serum albumin, Sigma–Aldrich, France) as standard. Microsomes were then aliquotted and stored at –80 °C.

#### 2.4. Measurement of brain and ovarian aromatase activities

Aromatase activity was determined by the tritiated water assay which measures the release of tritiated water during the conversion of [ $1\beta$ - $3H$  ( $N$ )]androst-4-ene-3,17-dione to estrone (Thompson and Siiteri, 1974). Optimal concentrations of brain and gonads microsomal proteins were determined as well as concentration of substrate, the duration and the temperature at which the enzymatic reaction occurred. The resulting assay protocol is described below. For the aromatase assay, 200  $\mu$ g of brain or ovarian microsomal proteins were added to a potassium phosphate buffer (50 mM) containing a NADPH-generating system and consisting of 20  $\mu$ M  $\beta$ -NADPH, 1 mM  $\beta$ -NADP, 10 mM glucose-6-phosphate, and 2 U/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase. To assess the effect of test compounds on aromatase activity, substances were dissolved in either

dimethylsulfoxide (DMSO) or ethanol. Solvent concentration did not exceed 0.2% of the final reaction mixture, i.e. 500  $\mu$ L. Test compounds were incubated with microsomes during 1 h at 27 °C. The rationale for choosing 1 h of incubation was to increase sensitivity of the aromatase assay. Indeed in a preliminary experiment, we showed that brain and ovarian IC<sub>50</sub> (defined as the concentration of chemical required for 50% inhibition of aromatase activity) calculated for 4-hydroxyandrostenedione were respectively 1.8 and 4.5 times lower for 1 h of incubation compared to 10 min (data not shown). After 1 h at 27 °C, the reaction was started by addition of 75 nM of [ $1\beta$ - $3H$  ( $N$ )]androst-4-ene-3,17-dione. Appropriate controls without substrate (tissue control), cofactors, and substitution of microsomal proteins for BSA, and addition of the specific aromatase inhibitor 4-hydroxyandrostenedione at a concentration of 0.5  $\mu$ M were used. After 30 min at 27 °C, the reaction was stopped by the addition of 1 mL of chloroform. After extensive vortexing for 30 s, the tubes were centrifuged at 3000 g (10 min, 4 °C). The aqueous layer was removed and extracted again with 1 mL of chloroform. The aqueous layer was mixed with charcoal (5%, w/v) to eliminate remaining organic compounds, vortexed for 30 s and centrifuged at 4000 g (20 min, 4 °C). Then two aliquots of the supernatant (2  $\times$  150  $\mu$ L) were mixed with 750  $\mu$ L of scintillation liquid (OptiPhase ‘Hi safe’ 3, Perkin

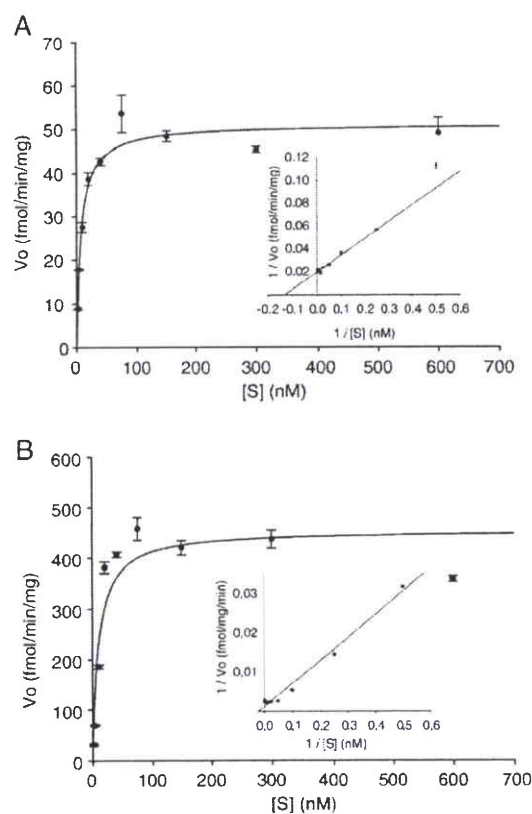


Fig. 2. Saturation analysis of aromatase activity (AA) in: (A) ovarian microsomes, and (B) brain microsomes of rainbow trout. Brain and ovaries were incubated 30 min at 27 °C with increasing concentrations of 1- $\beta$ [ $3H$ ]-androstenedione from 2 to 600 nM. Insets: Lineweaver–Burk plots to determine the V<sub>max</sub> and the K<sub>m</sub>.

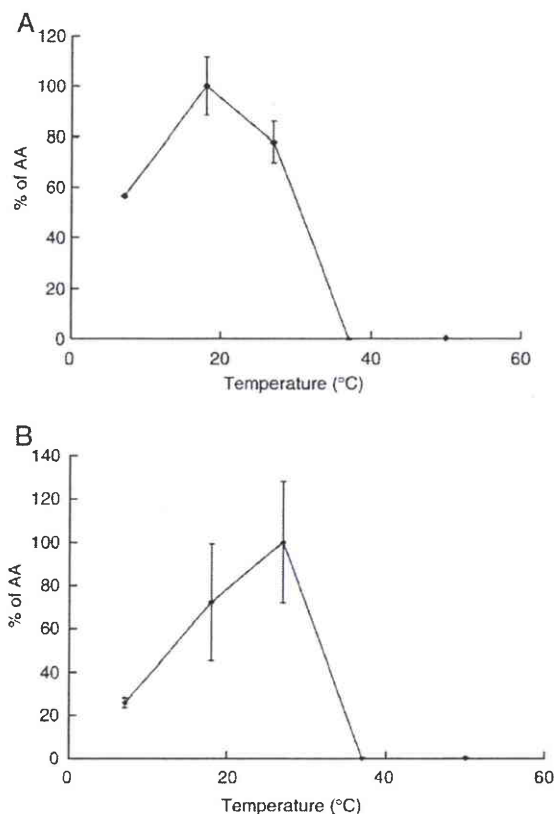


Fig. 3. Effect of temperature on the rainbow trout aromatase activities (AA) in brain (A) and ovary (B). The concentration of substrate was 75 nM and the amount of protein 200  $\mu$ g. AA were expressed as percent of maximal AA measured for each tissue.

Elmer, France) in two different wells of a 24-well plate (Flexibles plates 24-w, Perkin Elmer) and counted for 2 min in a Liquid Scintillation Counter (Microbeta, Perkin Elmer). As a first screening step all xenobiotics were tested at 10  $\mu$ M. For  $IC_{50}$  determination, all compounds were tested at concentrations between 10 nM and 100  $\mu$ M except aminoglutethimide for which one concentration was added (250  $\mu$ M) and androsta-trienedione and 4-hydroxyandrostenedione which were tested between 0.01 nM and 1  $\mu$ M.

### 3. Data analysis and statistics

The enzyme kinetic parameter ( $V_{max}$  and  $K_m$ ) were calculated from Lineweaver-Burk inverse plots. The aromatase inhibition potency of the tested substances was expressed as  $IC_{50}$  calculated using the Regtox macro for Microsoft Excel freely available at <http://eric.vindimian.9online.fr/download.html> REGTOX\_EV7.0.5.xls (Vindimian et al., 1983). Data were also expressed by the relative potency of aromatase inhibition (RPAI) calculated as the ratio of  $IC_{50}$  value of 4-hydroxyandrostenedione to test compound. Experimental data were expressed as mean  $\pm$  standard deviation ( $N=3$  independent experiments performed in duplicate). The SPSS™ software version 10.1 for Windows (SPSS, USA) was used for statistical analysis.

## 4. Results

### 4.1. Establishment and optimization of the microsomal aromatase assay

#### 4.1.1. Subcellular localisation of the aromatase activity and specificity of the aromatase assay

Aromatase activity was measured in the microsomal and cytosolic fraction of brain and gonads. In both brain and ovaries, the highest aromatase activity was located in the microsomal fraction (>90% in the microsomes and <10% in the cytosol, data not shown), which is in agreement with the subcellular localisation of the aromatase enzyme, i.e. the endoplasmic reticulum (Simpson et al., 1994). In controls (without substrate or cofactor, substitution of microsomes for BSA or with 4 hydroxyandrostenedione), no aromatase activity was found (data not shown). All together, these experiments showed that the method is specific of the aromatization reaction.

#### 4.1.2. Effect of amount of microsomal protein and time of incubation on microsomal aromatase activity

In the tritiated water assay, quantification of aromatase activity depends on degree of linearity of the reaction with respect to time and amount of total protein. At all concentrations of microsomal proteins tested (0.1, 0.2 and 0.5 mg), aromatase activities in brain and ovaries were linear for up to 30 min (Fig. 1). Accordingly,

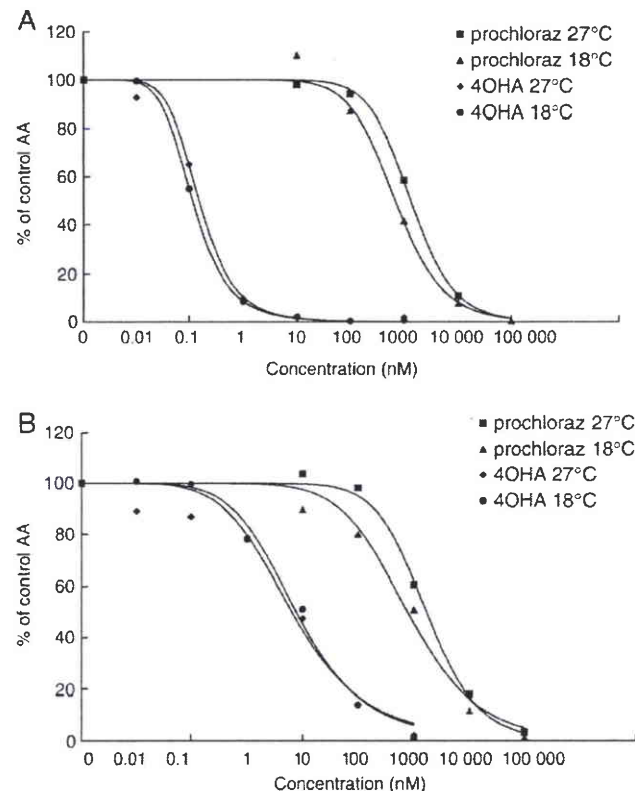


Fig. 4. Effect of temperature on brain and ovarian  $IC_{50}$  values for two aromatase inhibiting substances (prochloraz and 4-hydroxyandrostenedione (4-OHA)).  $IC_{50}$  values calculated in ovary (A) and brain (B) for each substance at 18 °C and 27 °C were not significantly different (Student's  $t$  test,  $p>0.05$ ).

brain and ovarian aromatase activities measured after 30 min were proportional to the amount of microsomal proteins in the assay (data not shown). Based on these results, 200 µg of microsomal proteins and 30 min of incubation time were chosen as standard procedure for the subsequent measurements on brain and ovarian aromatase activities.

#### 4.1.3. Effect of substrate concentration on brain and ovarian microsomal aromatase activities: determination of affinity for androstenedione ( $K_m$ ) and maximum reaction rates ( $V_{max}$ )

In order to ensure saturating concentration of substrate available for the enzyme, the effect of substrate concentration on brain and ovarian aromatase activities was assessed. In brain and ovarian microsomes, aromatase activity was maximal at 75 nM of radiolabelled androstenedione and above (Fig. 2A, B). This concentration was chosen to ensure that the substrate was not limiting.

By using the established aromatase assay, the rainbow trout aromatase affinity for androstenedione ( $K_m$ ) and its maximum reaction rate ( $V_{max}$ ) were determined in both brain and ovarian microsomes (Fig. 2A, B). The  $K_m$  values for androstenedione in brain and ovary were  $9.9 \pm 2.6$  nM and  $7.48 \pm 1.14$  respectively without significant difference. In contrast,  $V_{max}$  were much higher in brain ( $V_{max} = 453.7 \pm 24.5$ ) than in ovary ( $51.0 \pm 1.5$  fmol/mg/min) (Fig. 2A, B).

#### 4.1.4. Effect of incubation temperature of microsomes on aromatase activity

Variations of the incubation temperature resulted in significant changes in aromatase activity (Fig. 3A, B). In brain and in ovarian microsomes, aromatase activity was maximal at 18 °C and 27 °C respectively. At 37 °C, aromatase activities in both brain and gonad were completely inhibited. In order to verify that temperature did not influence the effects of xenobiotics in the aromatase assay, microsomes were exposed to known aromatase inhibitors and incubated at 18 or 27 °C. As shown by the Fig. 4, the calculated brain and ovarian  $IC_{50}$  for 4-hydroxyandrostenedione and prochloraz were the same at both temperatures. Based on this data, the incubation temperature used for the microsomal assay was set at 27 °C.

Table 1

Aromatase activity (AA) measured in the different batches of microsomes isolated from brain or ovary of females rainbow trout having different GSI

GSI	AA in brain microsomes (fmol/mg/min)	AA in ovarian microsomes (fmol/mg/min)
Low GSI	$153.9 \pm 59.3^{a,d}$	$43.8 \pm 6.0^c$
<1%	$n = 16$	$n = 27$
Medium GSI	$146.8 \pm 5.1^a$	$107.7 \pm 27.6^d$
8%–13%	$n = 13$	$n = 11$
High GSI	$428.9 \pm 46.5^b$	BDL
>13%	$n = 15$	$n = 3$

The number of batch/group of GSI is detailed in the Materials and methods.  $n$  = number of independent measures performed on different batches of brain or ovarian microsomes. Different letters indicate statistically different values (Kruskal–Wallis test, and Mann–Whitney U test,  $p < 0.05$ ). BDL = Below Detection Limit.

Table 2

Effect of environmental pollutants on aromatase activity (AA) in microsomes prepared from brain and ovary of rainbow trout

Chemicals family	Chemicals	% of control AA (brain)	% of control AA (ovary)	
	Control	$100.0 \pm 8.4$	$100 \pm 10.3$	
Steroidal inhibitor	4OHA (1 µM)	$2.7 \pm 0.4^*$	$3.1 \pm 3.1^*$	
	ATD (1 µM)	$3.9 \pm 0.9^*$	$2.1 \pm 0.2^*$	
	Aminoglutethimide	$84.7 \pm 2.8^*$	$70.7 \pm 1.3^*$	
Non steroidal inhibitor	Cadmium chloride	$106.1 \pm 8.6$	$98.6 \pm 10.3$	
	Lead acetate	$101.8 \pm 7.8$	$99.2 \pm 12.0$	
	Methyl mercury	$75.9 \pm 2.1^*$	$15.7 \pm 26.7^*$	
	Triphenylarsine	$107.8 \pm 3.7$	$86.4 \pm 1.5$	
	H <sub>3</sub> AsO <sub>4</sub>	$100.1 \pm 2.6$	$100.0 \pm 4.4$	
PAH	Benzo[a]Pyrene	$98.3 \pm 2.0$	$102.9 \pm 0.9$	
	Chrysene	$99.7 \pm 1.1$	$105.2 \pm 4.7$	
Insecticides	Organochlorine	Aldrin (100 nM)	$92.5 \pm 2.2$	$89.9 \pm 4.7$
		Chlordane	$105.5 \pm 10.5$	$110.0 \pm 9.5$
		Endosulfan	$111.7 \pm 0.3$	$107.6 \pm 0.4$
		Heptachlor (100 nM)	$89.7 \pm 8.8$	$89.7 \pm 11.7$
		Methoxychlor	$113.5 \pm 2.3$	$84.5 \pm 1.6$
		Fipronil	$107.2 \pm 1.4$	$101.7 \pm 19.4$
		Pyrethroids	Alpha-cypermethrin	$83.7 \pm 5.9$
	Permethrin	$87.3 \pm 8.4$	$94.1 \pm 4.9$	
Fungicides	Benzimidazol	Benomyl	$116.7 \pm 0.4$	$102.3 \pm 0.6$
		Difenoconazole	$81.7 \pm 2.7^*$	$75.9 \pm 2.9^*$
		Fenbuconazole	$7.1 \pm 0.9^*$	$6.7 \pm 3.2^*$
Triazole	Propiconazole	$10.1 \pm 0.6^*$	$5.9 \pm 0.5^*$	
	Triadimenol	$53.2 \pm 1.5^*$	$69.8 \pm 0.7^*$	
	Clotrimazole	$3.6 \pm 0.1^*$	$0.0 \pm 0.7^*$	
	Imazalil	$3.8 \pm 0.5^*$	$2.6 \pm 0.2^*$	
	Prochloraz	$18.0 \pm 0.1^*$	$10.8 \pm 0.4^*$	
Dicarboximide	Iprodion	$115.1 \pm 13.4$	$102.3 \pm 4.9$	
		Vinclozoline	$100.5 \pm 14.7$	$111.1 \pm 11.7$
Pyrimidine	Bupirimate	$102.2 \pm 8.9$	$92.2 \pm 5.3$	
	Fenarimol	$46.4 \pm 1.1^*$	$56.9 \pm 0.8^*$	
Herbicides	Oxadiazon	$87.5 \pm 5.1$	$81.4 \pm 5.7$	
		Metolachlor	$106.0 \pm 4.5$	$109.6 \pm 1.1$
		Atrazine	$114.7 \pm 4.2$	$104.7 \pm 3.2$
		Simazine	$98.0 \pm 14.1$	$108.7 \pm 8.8$
		Trifluralin	$103.9 \pm 12.6$	$102.1 \pm 4.7$
		Mecoprop	$105.8 \pm 3.3$	$99.7 \pm 5.4$
		Diuron	$97.7 \pm 3.9$	$85.2 \pm 4.5$
		Isoproturon	$93.9 \pm 8.1$	$89.9 \pm 1.9$
		Azimsulfuron	$112.9 \pm 3.7$	$95.3 \pm 18.7$
		Amitrol	$101.0 \pm 0.9$	$93.8 \pm 5.2$
		Pentachlorophenol	$109.8 \pm 9.6$	$98.3 \pm 1.6$
		TCDD (10–9 M)	$112.0 \pm 2.6$	$101.3 \pm 3.1$
		TCDD (10–8 M)	$116.7 \pm 6.0$	$89.6 \pm 2.6$
		Tributyltin chloride	$91.4 \pm 1.9$	$86.6 \pm 0.1$

All chemicals were tested at 10 µM except 4OHA (4-hydroxyandrostenedione), ATD (androstatrienedione), aldrin, heptachlor, and TCDD. The other concentrations are indicated in the table. Values are means of triplicates  $\pm$  standard deviation. \* indicate a significant difference compared to control (Student's  $t$  test,  $p < 0.05$ ).

#### 4.1.5. Brain and ovarian aromatase activities measured in the different batches of microsomes

Whatever the batch of microsomes, brain aromatase activity was systematically higher than ovarian activity (Table 1). Moreover, brain and ovarian aromatase activities were significantly different among batches: in microsomes isolated from the “high

Table 3  
Comparative inhibition of aromatase activities in brain and ovarian microsomes in rainbow trout

Chemical name	Brain IC <sub>50</sub> (μM)	Ovarian IC <sub>50</sub> (μM)	Ratio brain/ovarian IC <sub>50</sub>	RPAI brain	RPAI ovary	IC <sub>50</sub> in placental assay (μM)	IC <sub>50</sub> in cells based assays (μM)	IC <sub>50</sub> in rainbow trout ovarian assay (μM)
4-OH androstenedione	0.009±0.001	0.00015±0.00003	60.0	1	1	0.04 <sup>(n)</sup> –1.4 <sup>(b)</sup>	0.0011 <sup>(c)</sup> –0.08 <sup>(d)</sup>	#1.5 <sup>(e)</sup>
Androstatrienedione	0.015±0.003	0.00025±0.00018	60.0	0.6	0.6	–	–	##0.5 <sup>(f)</sup>
Aminoglutethimide	197±54	36.8±12.0	5.4	4.6E-05	4.1E-06	1 <sup>(g)</sup> –130 <sup>(f)</sup>	2.25 <sup>(c)</sup> –15.8 <sup>(d)</sup>	39 <sup>(f)</sup> , Ki=2.4 <sup>(h)</sup>
Clotrimazole	0.011±0.004	0.016±0.001	0.7	0.8	0.009	0.43 <sup>(i)</sup> –1.8 <sup>(j)</sup>	–	0.05 <sup>(k)</sup> , 0.9 <sup>(l)</sup>
Imazalil	0.43±0.03	0.32±0.21	1.3	2.1E-02	4.7E-04	0.04 <sup>(m)</sup> –0.15 <sup>(j)</sup>	0.0044 <sup>(c)</sup> –0.1 <sup>(n)</sup>	5 <sup>(k)</sup>
Prochloraz	1.3±0.4	1.0±0.5	1.3	6.9E-03	1.5E-04	0.34 <sup>(m)</sup> –0.70 <sup>(j)</sup>	0.1 <sup>(n)</sup>	5 <sup>(k)</sup> , (11–7.2) <sup>(o)</sup>
Fenbuconazole	1.3±0.4	0.21±0.05	6.2	6.9E-03	7.1E-04	–	–	–
Propiconazole	0.9±0.3	0.9±0.6	1.0	1.0E-02	1.7E-04	6.5 <sup>(m)</sup>	0.96 <sup>(c)</sup> –5 <sup>(n)</sup>	–
Difenoconazole	70±7	29±6	2.4	1.3E-04	5.2E-06	–	4 <sup>(n)</sup>	–
Triadimenol	11±0.7	26±2	0.4	8.2E-04	5.8E-06	21 <sup>(m)</sup>	12.6 <sup>(p)</sup>	–
Fenarimol	6±1	18±6	0.3	1.5E-03	8.3E-06	4.1 <sup>(a)</sup> –10 <sup>(m)</sup>	2 <sup>(m, c)</sup>	–
Methylmercury	11±1	0.78±0.07	14.1	8.2E-04	1.9E-04	–	–	–

The relative inhibition potency was calculated in comparison with 4-hydroxyandrostenedione. Dose–response experiments were conducted three times for each compound tested. Published IC<sub>50</sub> values of the studied pesticides for placental assay, cells based assays and rainbow trout ovarian assay are also reported.

RPAI: relative potency of aromatase inhibition, #=80% of inhibition, ##=100% of inhibition, \*=roach brain microsomes, \*\*=S9 fraction from brain fathead minnow, \*\*\*=rat ovarian microsomes (a) France et al., 1987; (b) Geelen et al., 1991; (c) Ohno et al., 2004; (d) Yue and Brodie, 1997; (e) Shilling et al., 1999; (f) Pelissero et al., 1996; (g) Le Bail et al., 2000; (h) Zhao et al., 2001; (i) Ayub and Levell, 1990; (j) Mason et al., 1987; (k) Monod et al., 1993; (l) Noaksson et al., 2003; (m) Vinggaard et al., 2000, (n) Sanderson et al., 2002, (o) Anklely et al., 2005, (p) Trosken et al. (2004), (q) Hirsch et al. (1987).

GSI” group, brain aromatase activity was significantly higher than in microsomes isolated from fish of the “low” and “medium” GSI groups. In contrast, no aromatase activity was measured in ovarian microsomes isolated from females of the “high GSI” group. From a practical point of view, the effect of environmental pollutants on brain and ovarian aromatase activities was tested on microsomes of the “medium GSI group”, where both brain and ovarian aromatase activities were high.

#### 4.1.6. Effect of environmental pollutants on brain and ovarian aromatase activities

Forty three environmental chemicals from different chemical classes were tested for their ability to interfere with brain and ovarian aromatase activities. As a first screening step, experiments were conducted by testing all the compounds at 10 μM except for few of them which were tested at lower concentrations due to solubility limitations. The results from these experiments are summarized in Table 2. Twelve out of 43 substances were potent inhibitors of aromatase activity *in vitro* at 10 μM both in the brain and ovaries: androstatrienedione, 4-hydroxyandrostenedione, aminoglutethimide, clotrimazole, fenarimol, difenoconazole, fenbuconazole, imazalil, prochloraz, propiconazole, triadimenol, and methylmercury (Table 2). None of the other tested chemicals exhibited any significant effect on aromatase activity at the concentrations tested. For the active substances, dose–response experiments were then conducted to determine their IC<sub>50</sub> values. The results are summarized in Table 3. Steroidal compounds (4-hydroxyandrostenedione and androstatrienedione) were found to be the most potent aromatase inhibitors with IC<sub>50</sub> values in the low nM range. The non steroidal compound aminoglutethimide was found to be the least potent aromatase inhibitor among all the inhibiting substances tested in this study with a relative potency of aromatase inhibition (RPAI) for brain and ovary equal to  $4.6 \times 10^{-5}$  and  $4.1 \times 10^{-6}$  respectively compared to 4-hydroxyandrostenedione. In contrast, the imidazole fungicide clotrimazole inhibited the brain and ovarian aromatase

activities with a potency of inhibition in brain close to that of 4-hydroxyandrostenedione (RPAI<sub>brain</sub>=0.8 and RPAI<sub>ovary</sub>=0.009). With the exception of methylmercury, all the aromatase inhibiting xenobiotics were fungicides belonging to the triazole, imidazole and pyrimidine families and were characterized by IC<sub>50</sub> values ranging from the low to the high μM range (Table 3). Linear regression analysis showed that there exists a significant and positive correlation between the inhibitory action of a substance on the ovarian aromatase and on the brain aromatase ( $R^2=0.85$ ; Pearson’s test,  $p<0.01$ , Fig. 5). Interestingly, despite this overall correlation, tissue specific effects were highlighted for certain chemicals. For the four fungicides (clotrimazole, imazalil, prochloraz and propiconazole), no significant differences of their brain and ovarian IC<sub>50</sub> values were noted. In contrast, 4 out of 12 compounds (4-hydroxyandrostenedione, androstatrienedione, difenoconazole, and methylmercury) showed ovarian IC<sub>50</sub> values significantly lower than those measured in the brain (Student’s *t* test,  $p<0.05$ ). IC<sub>50</sub> of aminoglutethimide and fenbuconazole were also lower than brain IC<sub>50</sub> but the difference was not

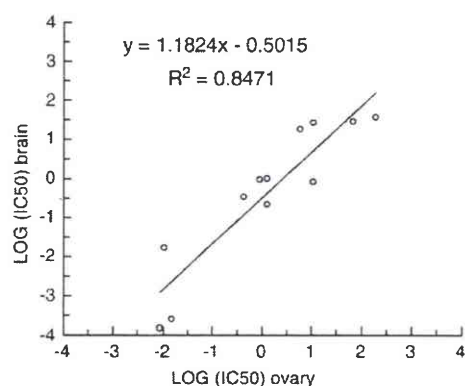


Fig. 5. Linear regression analysis between brain and ovarian LOG (IC<sub>50</sub>) values. Brain and ovarian IC<sub>50</sub> data were positively and significantly correlated (Pearson’s test,  $p<0.01$ ).

statistically significant (Student's *t* test,  $p=0.06$  and  $0.07$  respectively). Finally, triadimenol had stronger inhibitory effect on the brain than on the ovarian aromatase activity (Student's *t* test,  $p<0.05$ ). Fenarimol had the same pattern of inhibitory effect as triadimenol; the difference was not statistically significant.

## 5. Discussion

This paper describes the potential endocrine disrupting activity of xenobiotics by assessing their capacities to inhibit *in vitro* brain and ovarian aromatase activities of rainbow trout. We first optimized the tritiated water assay, characterized aromatase activity in the two target tissues and determined the kinetic parameters of the aromatase in brain and ovarian microsomes. Then we showed that several environmental substances are able to inhibit both brain and ovarian aromatase activities in a dose-dependent manner, indicating that they can potentially interfere with biosynthesis of endogenous estrogens and alter the androgen: estrogen ratio. Among them, methylmercury and the triazole fungicide fenbuconazole were newly identified as *in vitro* inhibitors of aromatase activity in a vertebrate model.

### 5.1. Rainbow trout brain and ovarian microsomal aromatase assay

The tritiated water assay to measure aromatase activity has been already applied to several fish species, including goldfish (*C. auratus*) (Pasmanik and Callard, 1985), medaka (*Oryzias latipes*) (Melo and Ramsdell, 2001), perch (*Perca fluviatilis*) and roach (*Rutilus rutilus*) (Noaksson et al., 2001), sea bass (*Dicentrarchus labrax*) (Gonzalez and Piferrer, 2002, 2003) and rainbow trout (*O. mykiss*) (Monod et al., 1993; Shilling et al., 1999). We aimed to optimize the assay in such a way that it fits to both ovarian and brain aromatase activities, and to determine whether brain and ovarian aromatase differ in their key kinetic parameters,  $V_{\max}$  and  $K_m$ . Amount of protein, length of incubation time, and substrate concentration were found to influence aromatase activity, a finding which is in accordance with the observations of Gonzalez and Piferrer (2002) on aromatase activity in sea bass. Also temperature influenced aromatase catalytic activity (this study, Gonzales and Piferrer, 2002). The temperature effect on aromatase activity has also been associated with decreasing cyp19 mRNA expression in tilapia with increasing water temperature (D'Cotta et al., 2001; Tsai et al., 2003). Aromatase activity of rainbow trout showed lower temperature maxima than aromatase activity of sea bass ( $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  for brain and ovary, respectively, in sea bass (Gonzalez and Piferrer, 2002)), a difference that might be related to the fact that rainbow trout is a cold water teleostean species while sea bass live at higher temperatures.

### 5.2. Comparison of the catalytic properties

To our knowledge, this study is the first to report  $V_{\max}$  and  $K_m$  values for both the brain and ovarian P450 aromatase in rainbow trout. The  $V_{\max}$  value of the brain aromatase is 9-fold higher than that of ovarian aromatase ( $453.72\pm 24.50$  and  $51.04\pm 1.52$  fmol/

mg/min respectively). These results are in accordance with the 10-fold higher  $V_{\max}$  of goldfish brain aromatase isoform compared to ovary isoform (Zhao et al., 2001) and are in line with the 4-fold higher  $V_{\max}$  of sea bass brain aromatase compared to ovary (Gonzalez and Piferrer, 2002). Moreover, the  $V_{\max}$  calculated for the ovaries is similar to the  $V_{\max}$  reported by Shilling et al. (1999) for rainbow trout ( $71.1$  fmol/mg/min). While brain exhibited higher catalytic activity compared to the ovary, brain and ovarian  $K_m$  values were not significantly different, demonstrating similar and very high affinities of both aromatases for androstenedione. Our data are well in accordance with  $K_m$  values reported in literature for other teleosts:  $5$  nM in goldfish brain homogenates (Pasmanik and Callard, 1988),  $8.2$  nM in goldfish brain microsomes (Zhao et al., 2001),  $4.1$  and  $3.4$  nM in brain and ovarian sea bass microsomes respectively (Gonzalez and Piferrer, 2002). However, it should be noted that our ovarian  $K_m$  value is in disagreement with that reported by Shilling et al. (1999) for rainbow trout who found a 40-fold higher value.

### 5.3. Effect of test chemicals on rainbow trout brain and ovarian aromatase activities

#### 5.3.1. Aromatase activity inhibition by known aromatase inhibitors

In this study three aromatase inhibitors were used, namely two steroidal inhibitors, 4-hydroxyandrostenedione and androstatrienedione, and a non steroidal inhibitor, aminoglutethimide. Steroidal inhibitors are steroid analogues of androstenedione. They bind irreversibly to the active site of the enzyme while non steroidal inhibitor act reversibly on P450 aromatase by interacting with the heme prosthetic group of the enzyme (Brodie et al., 1986; Yue and Brodie, 1997). The capacities of these pharmaceuticals to inhibit aromatase have been extensively studied in mammals notably within the context of estrogen-dependant cancer therapy (see Geisler and Lonning, 2005 for a review). By using different *in vitro* human systems (i.e., placental microsomes, human adrenocortical cells H295R, human choriocarcinoma-derived JEG3 cells), the human  $IC_{50}$  values reported for these molecules ranged from  $0.0015\text{ }\mu\text{M}$  to  $1.5\text{ }\mu\text{M}$  for 4-hydroxyandrostenedione and from  $0.0146\text{ }\mu\text{M}$  to  $55\text{ }\mu\text{M}$  for aminoglutethimide (see Table 3). Our results clearly show that these compounds act as aromatase inhibitors in rainbow trout as well. That rainbow trout aromatase activity appears to be more susceptible than that of some mammalian species may reflect the high affinity of these compounds for fish aromatase (Zhao et al., 2001). The inhibitory potency of the non steroidal aromatase inhibitor, aminoglutethimide, on brain and gonad aromatase activities of trout was much less expressed than that of the steroidal substances. This gives support to previous findings on goldfish and rainbow trout aromatase (Shilling et al., 1999; Zhao et al., 2001). By calculating the RPAI of aminoglutethimide for human aromatase based on  $IC_{50}$  data reported in different studies (Yue and Brodie, 1997; Ohno et al., 2004), we found that aminoglutethimide was 10 to 1200-fold less effective in inhibiting rainbow trout than human aromatase. Similarly, letrozole, exhibited a 1000-fold less inhibitory potency in rainbow trout than in human (Shilling et al.,

1999). A recent study reported 53% overall identity of the deduced amino-acid sequence of brain trout aromatase with that of human (Dalla Valle et al., 2002). This may imply that there exist differences of tertiary structure between human and trout P450 aromatase that could explain differences in efficacy and mechanism of inhibition (Pelissero et al., 1996; Shilling et al., 1999). The data of the present study show that there exist differences in the inhibitory potency of substances for trout and mammalian aromatase. Additionally, differences are evident between brain and gonad P450 aromatase. This underlines that although some knowledge is available for the inhibitory action of chemicals on aromatase activity in mammals, this cannot be linearly extrapolated to teleostean aromatase activity.

We found that the efficacy of inhibition of ovarian aromatase by aminoglutethimide and the two steroidal inhibitors were 5 and 60-fold higher respectively comparatively to brain. In the study of Zhao et al. (2001) it has been demonstrated that steroidal inhibitor have higher affinity for ovarian aromatase isozyme than brain aromatase in goldfish by determining the  $K_i$ . Given that rainbow trout aromatase activities in brain and ovary are supported by two structurally different proteins, i.e. P450AroA in ovary and P450AroB in brain (Dalla Valle et al., 2002), it is possible that the differences in the amino-acid sequences of rainbow trout aromatase isozymes account for distinct response to aromatase inhibitors ( $IC_{50}$  values) as previously suggested for goldfish aromatases (Zhao et al., 2001).

### 5.3.2. Aromatase inhibition by environmental substances

Among the environmental substances tested in this study, nine inhibited brain and ovarian aromatase activities in a dose-dependent manner among which were seven triazole and imidazole fungicides. Due to their well described capacity to inhibit sterol 14- $\alpha$ -demethylase which catalyses the synthesis of ergosterol, an essential membrane component in yeast and fungi, azole fungicides are widely used as antimycotic agents in agriculture and in human and veterinary therapies (Zarn et al., 2003). Various imidazole-like compounds have been shown to inhibit aromatase in human placenta microsomes, and in different cell lines expressing aromatase (Mason et al., 1987; Ayub and Levell, 1990; Vinggaard et al., 2000; Andersen et al., 2002; Sanderson et al., 2002; Ohno et al., 2004). In fish, data are scarcer. Previous studies reported that some imidazole fungicides (clotrimazole, prochloraz, imazalil) are able to inhibit aromatase activity in fish (Monod et al., 1993; Noaksson et al., 2003; Ankley et al., 2005). Our results confirm the capability of these imidazole fungicides to inhibit ovarian and also brain aromatase activities and extend the findings to other imidazole-like compounds. We found that clotrimazole was the most potent aromatase inhibitor of *in vitro* aromatase activity, both in brain and ovary, among all the tested imidazole-like compounds. This is similar to the results of Monod et al. (1993) who found that this substance was a much more potent ovarian aromatase inhibitor than prochloraz and imazalil (see Table 3). In a cyprinid fish species, the roach (*R. rutilus*), clotrimazole has also been shown to inhibit *in vitro* brain aromatase activity with an  $IC_{50}$  of 0.9  $\mu$ M (Noaksson et al., 2003). Brain and ovarian  $IC_{50}$  values obtained in the present study for clotrimazole were lower than those observed previously (Monod

et al., 1993; Noaksson et al., 2003) which is probably due to the use of optimized assay conditions and the resulting enhanced sensitivity of the assay. Besides, species difference cannot be ruled out since the highest  $IC_{50}$  value for clotrimazole was reported for the roach. This hypothesis is further supported by the very low degree of inhibition of aromatase by fenarimol in the fathead minnow compared to rainbow trout (Ankley et al., 2005). Nevertheless,  $IC_{50}$  values for prochloraz reported for the fathead minnow by Ankley et al. (2005) are similar to those reported in trout (Monod et al., 1993). Whether there exists species difference in sensitivity of aromatase remains to be determined.

Among the imidazole-like compounds tested in this study, only benomyl and amitrol had no effect on aromatase activity. The absence of an inhibitory effect of these two molecules is likely due to their chemical structures. Although relationship between the structure and the biological activity as inhibitors of aromatase is not simple (Sanderson et al., 2002), it has been shown that both molecules containing an imidazole ring fused to a benzene ring (e.g. benomyl) and molecules containing an imidazole ring without aromatic ring on the *N*-1 substituent (e.g. amitrol) are very weak inhibitors of human aromatase (Ayub and Levell, 1988). Therefore, our results strongly suggest that this type of structure activity described for human aromatase is also true for rainbow trout brain and ovarian aromatase.

Among the other substances tested, only methylmercury inhibited brain and ovarian aromatase activities in a dose-dependent manner. The ability of this substance to inhibit vertebrate aromatase has not been described before and the mechanism of inhibition remains to be determined. Molecules such as TBT, lead, TCDD, B[a]P, chrysene, atrazine, simazine, or vinclozoline are known to perturb aromatase expression *in vitro* in different cell systems (Letcher et al., 1999; Monteiro et al., 2000; Saitoh et al., 2001; Sanderson et al., 2001, 2002; Taupeau et al., 2003) but failed to produce any effect in our cell-free system. These differences rely most probably on the mechanism of action of these substances which are able of up- or down regulating the aromatase gene transcription (Saitoh et al., 2001; Sanderson et al., 2001, 2002; Taupeau et al., 2003).

The *in vitro* microsomal aromatase assay is limited to measuring the inhibitory effects of the test compound on aromatase enzymatic activity through direct interaction with the enzymatic complex but does not provide any information on the effect of the test agent on the gene/protein machinery. Nonetheless, the aromatase assay can be used for ecotoxicological screening in order to identifying and characterizing the mode of action and endocrine effects of environmental contaminants on a key steroidogenic enzyme. Since brain and ovarian Log  $IC_{50}$  values were significantly and positively correlated (Fig. 5), environmental contaminants can be tested either on brain or ovarian microsomes. However, brain microsomes can be recommended since brain aromatase activities can be measured whatever the maturity of fish.

Several of the aromatase inhibiting substances found in our study are known to be present in the aquatic environment and to accumulate in fish. Methylmercury is a well-known contaminant of the aquatic food web that may adversely affect reproduction of wild population of fish (Drevnick and Sandheinrich, 2003). In a recent survey of pharmaceuticals in

aquatic environment, it has been shown that the fungicide clotrimazole was present at low concentrations (up to 33 ng/L) in some UK estuaries and rivers (Thomas and Hilton, 2004; Roberts and Thomas, 2006). In surface water of French rivers, difenoconazole, fenbuconazole, iprodion, prochloraz and propiconazole have been measured at mean concentrations in the low ng/L range with maximal concentration of 1.75 µg/L for propiconazole (IFEN, 2001). As a consequence, all these substances could potentially represent a risk for fish populations and may be involved in altered aromatase activity that have been observed in wild fish population inhabiting contaminated water (Noaksson et al., 2001, 2003, 2004, 2005; Orlando et al., 2002; Lavado et al., 2004; Martin-Skilton et al., 2006). However, few studies have been conducted to assess the *in vivo* effect of these compounds on brain and ovarian aromatase activities in fish and it would be advisable to determine to which extent the inhibitory potency of xenobiotics on *in vitro* aromatase activity can be extrapolated to the *in vivo* situation. Our results concerning the inhibitory effect of methylmercury on brain and ovarian aromatase activities are consistent with the decreasing circulating concentrations of estradiol measured in female fathead minnow fed with methylmercury (Drevnick and Sandheinrich, 2003). Similarly, prochloraz in the fathead minnow caused a suite of *in vivo* responses consistent with inhibition of steroidogenesis, i.e. decrease of estradiol and vitellogenin synthesis in female (Ankley et al., 2005). However, the same authors showed that the endocrine effects of fenarimol were more ambiguous with notably an increased concentration of circulating estradiol in female. Shilling et al. (1999) failed to demonstrate any effect on aromatase and vitellogenin synthesis in juvenile female rainbow trout exposed to clotrimazole. All these data suggest that extrapolation of *in vitro* study of xenobiotics interference with aromatase enzyme (and more generally steroidogenic enzyme) to the *in vivo* situation is not an easy task. It should be related to the *in vivo* pharmacokinetic and the multiple mode of action of these molecules on the endocrine system as well as the complexity of the synthesis pathway (Andersen et al., 2002; Sanderson and Van den Berg, 2003; Ankley et al., 2005). Taken together, further *in vivo* studies are needed.

## 6. Conclusion

The optimized aromatase activity assay with rainbow trout microsomes developed in this study is a suitable test for screening for aromatase inhibiting activities of environmental contaminants. The assay can distinguish inhibitory effects in the brain and the ovary, and we show for the first time that the two tissues differ in their sensitivity to chemical inhibition. While ovary exhibited a higher sensitivity to steroidal inhibitors as compared to brain, the sensitivity of the two aromatases to environmental substances was broadly similar indicating that brain and ovarian aromatase are relevant biochemical target of EDCs. Our study also indicates that methylmercury and some pesticides (clotrimazole, imazalil, prochloraz, fenbuconazole, propiconazole, difenoconazole, triadimenol, and fenarimol), that are currently used throughout the world, have the potential to interfere with

the biosynthesis of endogenous estrogens. Based on these results, it can be suggested that these compounds will affect the functioning of the HPG axis and in turn sexual development and reproduction of fish. However, further *in vivo* studies are needed to support these hypotheses.

## Acknowledgement

This study was supported by the French Ministry of Ecology and Sustainable Development (Budget Civil de Recherche et Développement, BCRD Grant AP17-02). N. Hinfray is funded by INERIS and ARNT (National association for technical research). The authors would like to express their thanks to Dr. Sélim Aït-Aissa (Unité d'évaluation des risques écotoxicologiques, INERIS), Professor Helmut Segner (University of Bern, Centre for Fish and Wildlife Health, Switzerland) and Professor Roger A. Coulombe (Utah State University, Department of Veterinary Sciences, USA) for their critical reading and comments of the manuscript and for English corrections.

## References

- Andersen, H.R., Vinggaard, A.M., Rasmussen, T.H., Gjermandsen, I.M., Bonefeld-Jorgensen, E.C., 2002. Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity, and aromatase activity in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 179, 1–12.
- Ankley, G.T., Jensen, K.M., Durhan, E.J., Makynen, E.A., Butterworth, B.C., Kahl, M.D., Villeneuve, D.L., Linnum, A., Gray, L.E., Cardon, M., Wilson, V.S., 2005. Effects of two fungicides with multiple modes of action on reproductive endocrine function in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicol. Sci.* 86, 300–308.
- Ayub, M., Levell, M.J., 1988. Structure-activity relationships of the inhibition of human placental aromatase by imidazole drugs including ketoconazole. *J. Steroid Biochem.* 31, 65–72.
- Ayub, M., Levell, M.J., 1990. The inhibition of human prostatic aromatase activity by imidazole drugs including ketoconazole and 4-hydroxyandrostenedione. *Biochem. Pharmacol.* 40, 1569–1575.
- Blazquez, M., Piferrer, F., 2004. Cloning, sequence analysis, tissue distribution, and sex-specific expression of the neural form of P450 aromatase in juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Mol. Cell. Endocrinol.* 219, 83–94.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Brion, F., Tyler, C.R., Palazzi, X., Laillet, B., Porcher, J.M., Garric, J., Flammarion, P., 2004. Impacts of 17(–estradiol, including environmentally relevant concentrations, on reproduction after exposure during embryo-larval-, juvenile- and adult-life stages in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 68, 193–217.
- Brodie, A.M., Wing, L.Y., Goss, P., Dowsett, M., Coombes, R.C., 1986. Aromatase inhibitors and their potential clinical significance. *J. Steroid Biochem.* 25, 859–865.
- Callard, G.V., Tchoudakova, A., 1997. Evolutionary and functional significance of two CYP19 genes differentially expressed in brain and ovary of goldfish. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 61, 387–392.
- Chiang, E.F., Yan, Y.L., Guiguen, Y., Postlethwait, J., Chung, B., 2001a. Two Cyp19 (P450 aromatase) genes on duplicated zebrafish chromosomes are expressed in ovary or brain. *Mol. Biol. Evol.* 18, 542–550.
- Chiang, E.F., Yan, Y.L., Tong, S.K., Hsiao, P.H., Guiguen, Y., Postlethwait, J., Chung, B.C., 2001b. Characterization of duplicated zebrafish cyp19 genes. *J. Exp. Zool.* 290, 709–714.
- Dalla Valle, L., Ramina, A., Vianello, S., Belvedere, P., Colombo, L., 2002. Cloning of two mRNA variants of brain aromatase cytochrome P450 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 82, 19–32.

- D'Cotta, H., Fostier, A., Guiguen, Y., Govoroun, M., Baroiller, J.-F., 2001. Aromatase plays a key role during normal and temperature-induced sex differentiation of tilapia *Oreochromis niloticus*. *Mol. Reprod. Dev.* 59, 265–276.
- Drevnick, P.E., Sandheinrich, M.B., 2003. Effects of dietary methylmercury on reproductive endocrinology of fathead minnows. *Environ. Sci. Technol.* 37, 4390–4396.
- Flouriot, G., Pakdel, F., Ducouret, B., Ledrean, Y., Valotaire, Y., 1997. Differential regulation of two genes implicated in fish reproduction: vitellogenin and estrogen receptor genes. *Mol. Reprod. Dev.* 48, 317–323.
- Forlano, P.M., Deitcher, D.L., Myers, D.A., Bass, A.H., 2001. Anatomical distribution and cellular basis for high levels of aromatase activity in the brain of teleost fish: aromatase enzyme and mRNA expression identify glia as source. *J. Neurosci.* 21, 8943–8955.
- France, J.T., Mason, J.I., Magness, R.R., Murry, B.A., Rosenfeld, C.R., 1987. Ovine placental aromatase: studies of activity levels, kinetic characteristics and effects of aromatase inhibitors. *J. Steroid Biochem.* 28, 155–160.
- Geelen, J.A., Deckers, G.H., van der Wardt, J.T., Loozen, H.J., Tax, L.J., Kloosterboer, H.J., 1991. Selection of 19-(ethylidithio)-androst-4-ene-3,17-dione (ORG 30958): a potent aromatase inhibitor in vivo. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 38, 181–188.
- Geisler, J., Lonning, P.E., 2005. Aromatase inhibition: translation into a successful therapeutic approach. *Clin. Cancer Res.* 11, 2809–2821.
- Gelinas, D., Pitoc, G., Callard, G.V., 1998. Isolation of a goldfish brain cytochrome P450 aromatase cDNA: mRNA expression during the seasonal cycle and after steroid treatment. *Mol. Cell. Endocrinol.* 138, 81–93.
- Gonzalez, A., Piferrer, F., 2002. Characterization of aromatase activity in the sea bass: effects of temperature and different catalytic properties of brain and ovarian homogenates and microsomes. *J. Exp. Zool.* 293, 500–510.
- Gonzalez, A., Piferrer, F., 2003. Aromatase activity in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) brain. Distribution and changes in relation to age, sex, and the annual reproductive cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.* 132, 223–230.
- Guiguen, Y., Baroiller, J.-F., Ricordel, M.-J., Iseki, K., McMeel, O.M., Martin, S.A.M., Fostier, A., 1999. Involvement of estrogens in the process of sex differentiation in two fish species: the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and a tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Mol. Reprod. Dev.* 54, 154–162.
- Hirsch, K.S., Weaver, D.E., Black, L.J., Falcone, J.F., MacLusky, N.J., 1987. Inhibition of central nervous system aromatase activity: a mechanism for fenarimol-induced infertility in the male rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 91, 235–245.
- Institut Français de l'Environnement (IFEN), 2001. Pesticides in Water, Fifth Annual Report, pp. 1–67.
- Jobling, S., Beresford, N., Nolan, M., Rodgers-Gray, T., Brighty, G.C., Sumpter, J.P., Tyler, C.R., 2002. Altered sexual maturation and gamete production in wild roach (*Rutilus rutilus*) living in rivers that receive treated sewage effluents. *Biol. Reprod.* 66, 272–281.
- Kishida, M., Callard, G.V., 2001. Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in zebrafish (*Danio rerio*) brain and ovary are differentially programmed and estrogen regulated during early development. *Endocrinology* 142, 740–750.
- Lavado, R., Thibaut, R., Raldua, D., Martin, R., Porte, C., 2004. First evidence of endocrine disruption in feral carp from the Ebro River. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 196, 247–257.
- Le Bail, J.C., Champavier, Y., Chulia, A.J., Habrioux, G., 2000. Effects of phytoestrogens on aromatase, 3 $\beta$  and 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activities and human breast cancer cells. *Life Sci.* 66, 1281–1291.
- Letcher, R.J., van Holsteijn, I., Drenth, H.-J., Norstrom, R.J., Bergman, A., Safe, S., Pieters, R., van den Berg, M., 1999. Cytotoxicity and aromatase (CYP19) activity modulation by organochlorines in human placental JEG-3 and JAR choriocarcinoma cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 160, 10–20.
- Martin-Skilton, R., Lavado, R., Thibaut, R., Minier, C., Porte, C., 2006. Evidence of endocrine alteration in the red mullet, *Mullus barbatus* from the NW Mediterranean. *Environ. Pollut.* 141, 60–68.
- Mason, J.I., Carr, B.R., Murry, B.A., 1987. Imidazole antimycotics: selective inhibitors of steroid aromatization and progesterone hydroxylation. *Steroids* 50, 179–189.
- Melo, A.C., Ramsdell, J.S., 2001. Sexual dimorphism of brain aromatase activity in medaka: induction of a female phenotype by estradiol. *Environ. Health Perspect.* 109, 257–264.
- Menuet, A., Pellegrini, E., Brion, F., Gueguen, M.-M., Dujardin, T., Anglade, I., Marmignon, M., Pakdel, F., Kah, O., 2005. Expression and estrogen-dependent regulation of the zebrafish brain aromatase gene. *J. Comp. Neurol.* 485, 304–320.
- Mills, L.J., Chichester, C., 2005. Review of evidence: are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations? *Sci. Total Environ.* 343, 1–34.
- Monod, G., De Mones, A., Fostier, A., 1993. Inhibition of ovarian microsomal aromatase and follicular estradiol suppression by imidazole fungicides in rainbow trout. *Mar. Environ. Res.* 35, 153–157.
- Monteiro, P.R.R., Reis-Henriques, M.A., Coimbra, J., 2000. Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit in vitro ovarian steroidogenesis in the flounder (*Platichthys flesus* L.). *Aquat. Toxicol.* 48, 549–559.
- Nash, J.P., Kime, D.E., Van der Ven, L.T., Wester, P.W., Brion, F., Maack, G., Stahlschmidt-Allner, P., Tyler, C.R., 2004. Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethynylestradiol causes reproductive failure in fish. *Environ. Health Perspect.* 112, 1725–1733.
- Noaksson, E., Tjarnlund, U., Bosveld, A.T.C., Balk, L., 2001. Evidence for endocrine disruption in perch (*Perca fluviatilis*) and roach (*Rutilus rutilus*) in a remote Swedish lake in the vicinity of a public refuse dump. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 174, 160–176.
- Noaksson, E., Linderth, M., Bosveld, A.T., Norrgren, L., Zebuhr, Y., Balk, L., 2003. Endocrine disruption in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) exposed to leachate from a public refuse dump. *Sci. Total Environ.* 305, 87–103.
- Noaksson, E., Gustavsson, B., Linderth, M., Zebuhr, Y., Broman, D., Balk, L., 2004. Gonad development and plasma steroid profiles by HRGC/HRMS during one reproductive cycle in reference and leachate-exposed female perch (*Perca fluviatilis*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 195, 247–261.
- Noaksson, E., Linderth, M., Tjarnlund, U., Balk, L., 2005. Toxicological effects and reproductive impairments in female perch (*Perca fluviatilis*) exposed to leachate from Swedish refuse dumps. *Aquat. Toxicol.* 75, 162–177.
- OECD, 1997. Draft Detailed Review Paper: Appraisal of Test Methods for Sex-hormone Disrupting Chemicals. OECD, Paris. 290.
- Ohno, K., Araki, N., Yanase, T., Nawata, H., Iida, M., 2004. A novel nonradioactive method for measuring aromatase activity using a human ovarian granulosa-like tumor cell line and an estrone ELISA. *Toxicol. Sci.* 82, 443–450.
- Orlando, E.F., Davis, W.P., Guillette Jr., L.J., 2002. Aromatase activity in the ovary and brain of the eastern mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) exposed to paper mill effluent. *Environ. Health Perspect.* 110 (Suppl 3), 429–433.
- Pasmanik, M., Callard, G.V., 1985. Aromatase and 5 alpha-reductase in the teleost brain, spinal cord, and pituitary gland. *Gen. Comp. Endocrinol.* 60, 244–251.
- Pasmanik, M., Callard, G.V., 1988. Changes in brain aromatase and 5 alpha-reductase activities correlate significantly with seasonal reproductive cycles in goldfish (*Carassius auratus*). *Endocrinology* 122, 1349–1356.
- Pelissero, C., Lenczowski, M.J.P., Chinzi, D., Davail-Cuisset, B., Sumpter, J.P., Fostier, A., 1996. Effects of flavonoids on aromatase activity, an in vitro study. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 57, 215–223.
- Roberts, P.H., Thomas, K.V., 2006. The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment. *Sci. Total Environ.* 356 (1–3), 143–153.
- Saitoh, M., Yanase, T., Morinaga, H., Tanabe, M., Mu, Y.-M., Nishi, Y., Nomura, M., Okabe, T., Goto, K., Takayanagi, R., Nawata, H., 2001. Tributyltin or triphenyltin inhibits aromatase activity in the human granulosa-like tumor cell line KGN\*1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289, 198–204.
- Sanderson, T., van den Berg, M., 2003. Interactions of xenobiotics with the steroid hormone biosynthesis pathway. *Pure Appl. Chem.* 75, 1957–1971.
- Sanderson, J.T., Letcher, R.J., Heneweer, M., Giesy, J.P., van den Berg, M., 2001. Effects of chloro-s-triazine herbicides and metabolites on aromatase activity in various human cell lines and on vitellogenin production in male carp hepatocytes. *Environ. Health Perspect.* 109, 1027–1031.
- Sanderson, J.T., Boerma, J., Lansbergen, G.W.A., van den Berg, M., 2002. Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 182, 44–54.



- Segner, H., Caroll, K., Fenske, M., Janssen, C.R., Maack, G., Pascoe, D., Schafers, C., Vandenberg, G.F., Watts, M., Wenzel, A., 2003. Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA project. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 54, 302–314.
- Shilling, A.D., Carlson, D.B., Williams, D.E., 1999. Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, as a model for aromatase inhibition. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 70, 89–95.
- Simpson, E.R., Mahendroo, M.S., Means, G.D., Kilgore, M.W., Hinshelwood, M.M., Graham-Lorence, S., Amarnah, B., Ito, Y., Fisher, C.R., Michael, M.D., 1994. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr. Rev.* 15, 342–355.
- Taupeau, C., Poupon, J., Treton, D., Brosse, A., Richard, Y., Machelon, V., 2003. Lead reduces messenger RNA and protein levels of cytochrome p450 aromatase and estrogen receptor beta in human ovarian granulosa cells. *Biol. Reprod.* 68, 1982–1988.
- Tchoudakova, A., Callard, G.V., 1998. Identification of multiple CYP19 genes encoding different cytochrome P450 aromatase isozymes in brain and ovary. *Endocrinology* 139, 2179–2189.
- Thomas, K.V., Hilton, M.J., 2004. The occurrence of selected human pharmaceutical compounds in UK estuaries. *Mar. Pollut. Bull.* 49, 436–444.
- Thompson Jr., E.A., Siiteri, P.K., 1974. Utilization of oxygen and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate by human placental microsomes during aromatization of androstenedione. *J. Biol. Chem.* 249, 5364–5372.
- Trant, J.M., Gavasso, S., Ackers, J., Chung, B.C., Place, A.R., 2001. Developmental expression of cytochrome P450 aromatase genes (CYP19a and CYP19b) in zebrafish fry (*Danio rerio*). *J. Exp. Zool.* 290, 475–483.
- Trosken, E.R., Scholz, K., Lutz, R.W., Volkel, W., Zarn, J.A., Lutz, W.K., 2004. Comparative assessment of the inhibition of recombinant human CYP19 (aromatase) by azoles used in agriculture and as drugs for humans. *Endocr. Res.* 30, 387–394.
- Tsai, C.L., Chang, S.L., Wang, L.H., Chao, T.Y., 2003. Temperature influences the ontogenetic expression of aromatase and oestrogen receptor mRNA in the developing tilapia (*Oreochromis mossambicus*) brain. *J. Neuroendocrinol.* 15, 97–102.
- Vindimian, E., Robaut, C., Fillion, G., 1983. A method for cooperative or noncooperative binding studies using nonlinear regression analysis on a microcomputer. *J. Appl. Biochem.* 5, 261–268.
- Vinggaard, A.M., Hnida, C., Breinholt, V., Larsen, J.C., 2000. Screening of selected pesticides for inhibition of CYP19 aromatase activity in vitro. *Toxicol. in Vitro* 14, 227–234.
- Yue, W., Brodie, A.M.H., 1997. Mechanisms of the actions of aromatase inhibitors 4-hydroxyandrostenedione, fadrozole, and aminoglutethimide on aromatase in JEG-3 cell culture. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 63, 317–328.
- Zarn, J.A., Bruschweiler, B.J., Schlatter, J.R., 2003. Azole fungicides affect mammalian steroidogenesis by inhibiting sterol 14 alpha-demethylase and aromatase. *Environ. Health Perspect.* 111, 255–261.
- Zhao, J., Mak, P., Tchoudakova, A., Callard, G., Chen, S., 2001. Different catalytic properties and inhibitor responses of the Goldfish brain and ovary aromatase isozymes. *Gen. Comp. Endocrinol.* 123, 180–191.



## **Article 3**



**Effect of clotrimazole on brain and gonadal aromatase in zebrafish (*Danio rerio*)**

Hinfray N.<sup>1</sup>, Aït-Aïssa S.<sup>1</sup>, Le Page Y.<sup>2</sup>, Gouze M.E.<sup>1</sup>, Porcher J.M.<sup>1</sup>, Kah O.<sup>2</sup>, Pakdel F.<sup>2</sup>, Brion F<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup> Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques, Direction des Risques Chroniques, Unité d'évaluation des risques écotoxicologiques, BP 2, 60550 Verneuil-en-Halatte, France

<sup>2</sup> Endocrinologie Moléculaire de la Reproduction, Unité Mixte de Recherche 6026 Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Rennes 1, 35042 Rennes, France

\* Corresponding author. Tel.: +33 (0)3 44 55 65 12; Fax: +33 (0)3 44 55 67 67

E-mail address: [Francois.Brion@ineris.fr](mailto:Francois.Brion@ineris.fr)

## ABSTRACT

Several chemical compounds have been characterised for their ability to alter aromatase activity and/or expression. In this regard, imidazole fungicides, such as clotrimazole, have been shown to inhibit aromatase activity in various mammalian and fish *in vitro* assays. However, the *in vivo* effects of this compound on aromatase have received little attention. The objective of our study was to assess the effect of clotrimazole, on aromatase activity / expression *in vivo* in a model fish species, the zebrafish (*Danio rerio*). Clotrimazole inhibited aromatase activity / expression in brain and ovary at high concentrations (100 and 500 µg/L), whereas, at lower concentrations (4 and 20 µg/L), clotrimazole enhanced aromatase activity and cyp19 genes expression in the two tissues and P450aroB synthesis in the brain. Given that induction of aromatase was unexpected, the ability of clotrimazole to induce cyp19a and cyp19b expression in zebrafish larvae was assessed and we confirmed the ability of this compound to induce cyp19b expression, a known ER-regulated gene. To gain deeper information on the nuclear mode of action of clotrimazole on cyp19b, we examined its estrogenic activity in two different ER-responsive reporter cell lines, the human glial cells (U251-MG) cells and the MELN cells. The *in vitro* assays gave no conclusive response given that clotrimazole was unable to induce luciferase activity in the U251-MG cells while it induced luciferase activity in MELN cells, the induction being ER-dependent. Although the precise mechanism of action of clotrimazole is still unknown, this study provides evidence that clotrimazole is able to perturb aromatase expression and activity *in vivo* in fish in two target tissues, the brain and the ovary, the *in vivo* effects being more complexes than those found *in vitro*.

## INTRODUCTION

It is now well-known that certain environmental contaminants have the potential to disrupt the normal endocrine function of organisms. Environmental contaminants that act as estrogen receptor agonists have received much attention in terms of potential effects on reproduction and development in fish and wildlife (World Health Organisation, 2002). However, interaction with hormone receptors is only one of several mechanisms of endocrine disrupting action. These substances have indeed many modes of action since they can potentially act on the synthesis, secretion, transport, action and elimination of endogenous hormones (Kavlock *et al.*, 1996; Segner *et al.*, 2003). In addition, function of the Hypophysis-Pituitary-Gonad axis can be affected by xenobiotics that affect metabolism of sex steroids (Ankley *et al.*, 2005). Particularly, cytochrome P450 enzymes responsible for the highly specific reactions in the steroid biosynthetic pathway (Miller, 1988) are potential targets, given their key role in the formation of various highly potent endogenous steroid hormones.

In this regard, the cytochrome P450 aromatase is of particular interest. Cytochrome P450 aromatase is a key steroidogenic enzyme which catalyses the critical reaction that converts C19 androgens such as testosterone and androstenedione to C18 estrogens such as estradiol and estrone, respectively (Simpson *et al.*, 1994; Lephart, 1996). This reaction is thought to be the rate limiting step in estrogen synthesis (Simpson *et al.*, 1994). In fish, P450 aromatase is mainly expressed in two tissues : brain and ovary (Trant *et al.*, 1997; Gelinas *et al.*, 1998; Kishida and Callard, 2001; Dalla Valle *et al.*, 2002; Hinfrey *et al.*, 2006). In contrast to mammals, except pig, which have only one aromatase gene (*cyp19*) with multiple tissue-specific promoters, most species of teleost fish examined to date have at least two separate aromatase genes (*cyp19a* and *cyp19b*) placed on different loci (Callard and Tchoudakova, 1997; Kishida and Callard, 2001; Dalla Valle *et al.*, 2002). These two genes (*cyp19a* and *cyp19b*) encode two structurally and functionally different proteins (P450aroA and P450aroB, respectively) (Tchoudakova and Callard, 1998; Chiang *et al.*, 2001a; Blazquez and Piferrer, 2004). *cyp19b* gene is predominantly expressed in brain and *cyp19a* gene is predominantly expressed in the ovary (Tchoudakova and Callard, 1998; Chiang *et al.*, 2001b; Forlano *et al.*, 2001; Kishida and Callard, 2001; Trant *et al.*, 2001; Blazquez and Piferrer, 2004; Menuet *et al.*, 2005). Moreover these two genes are subjected to different regulations and are differentially expressed during development (Kazeto *et al.*, 2001; Kishida and Callard, 2001). In teleosts fish, *cyp19b* gene is expressed at particularly high levels in the brain (with very high aromatase activity) when compared to *cyp19a* gene expression in the ovary and to

cyp19b gene expression in the brain of other vertebrates. The very high expression of cyp19b in the brain may be link to the capacity of fish brain to grow during adulthood (Gelinas *et al.*, 1998; Forlano *et al.*, 2001).

To date, several class of compounds such as PAHs and some pesticides have been shown to interfere with the aromatase enzyme *in vitro* (Monteiro *et al.*, 2000; Andersen *et al.*, 2002; Sanderson *et al.*, 2002; Hinfrey *et al.*, In press). Among pesticides, imidazole fungicides have been shown to be potent aromatase inhibitors in different cells systems (Andersen *et al.*, 2002; Sanderson *et al.*, 2002; Laville *et al.*, 2006) as well as in human placental (Mason *et al.*, 1987; Ayub and Levell, 1990; Vinggaard *et al.*, 2000) and in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) brain and ovarian microsomes (Monod *et al.*, 1993; Hinfrey *et al.*, In press). Among them, clotrimazole is of particular interest. In a previous work, we showed that it was the most potent aromatase inhibitor among the pesticides tested on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) *in vitro* brain and ovarian aromatase activities (Hinfrey *et al.*, In press). In human, this molecule is usually administered in cream or tablets to treat yeast infections of skin and vagina (OSPAR, 2005). The amount of active substance produced in Europe is in the range of 10 tons/year, and almost the same quantity is imported (OSPAR, 2005). In a recent survey of pharmaceuticals in aquatic environment, it has been shown that the fungicide clotrimazole was present at concentrations up to 33 ng/L in surface water of UK estuaries (Thomas and Hilton, 2004; Roberts and Thomas, 2006). Moreover, clotrimazole is expected to be persistent (half life estimated to be more than 60 days) and to bioaccumulate in fish (bioaccumulation factor for fish = 610) (OSPAR, 2005). Thus, fish exposed chronically to clotrimazole are susceptible to bioaccumulate.

The lack of information on *in vivo* effects of clotrimazole led us to assess its *in vivo* effects on aromatase expression / activity in zebrafish. Zebrafish brain and ovarian aromatase were showed to be good potential targets for endocrine disrupting chemicals (Hinfrey *et al.*, 2006). Indeed, estradiol was showed to totally inhibit cyp19a gene expression and aromatase activity in the ovary of adult female zebrafish. It was also showed to strongly induce cyp19b gene expression and P450aromataseB protein synthesis in the brain of zebrafish larvae (Menuet *et al.*, 2005; Hinfrey *et al.*, 2006). Androstatriendione, a steroidal aromatase inhibitor, inhibited aromatase activity in brain and ovary without altering cyp19 genes expression, suggesting a need to assess different levels of aromatase expression (gene, protein, enzyme activity) to determine the mode of action of an endocrine disrupting chemical (Hinfrey *et al.*, 2006). Thus, cyp19 genes expression, P450aroB protein synthesis and aromatase activity were measured in brain and ovary of adult female zebrafish. Cyp19 genes expression and



P450aromataseB protein synthesis were also assessed in zebrafish larvae after an exposure to clotrimazole. In this study, clotrimazole exerted unexpected inductive effect on aromatase expression / activity. Thus, an attempt was made in order to determine its mode of action by testing its estrogenicity in two different cellular systems.

## **MATERIALS AND METHODS**

### *Exposure of adult zebrafish*

Adult zebrafish (*Danio rerio*) were purchased from a commercial fish farm (Les serres aquatiques, France). Adult females were exposed for 7 days to clotrimazole (4, 20, 100, or 500 µg/L), solvent control (DMSO, 0.004% v/v) or only water. Exposures were realised in 4-L tanks under semi-static conditions with a total renewal of the water every day. Water was maintained at a temperature of  $24.1 \pm 1.6^{\circ}\text{C}$  and fish kept under a 14-hours light / 10-hours dark photoperiod. Each concentration was tested in two separated tanks. Fish from one replicate were used to measure aromatase activity (N = 10 fish), and those from the other one to measure cyp19a and cyp19b mRNA levels (N = 10 fish). Exposure of fish to graded concentrations of clotrimazole was repeated in a second experiment to confirm results from the first experiment.

### *Exposure of zebrafish larvae*

Zebrafish larvae of 17 dpf were exposed to clotrimazole (4, 20, 100, and 200 µg/L), 17-β-estradiol (E2, 10 nM = 2.7 µg/L), or to solvent alone (DMSO, 0.5% v/v) for 72 hours. Each experimental group was constituted of 20 zebrafish larvae exposed in 100 ml of water (with or without contaminant). One half of the water was renewed every day.

### *Fish dissection and tissue sampling*

Adult fish were euthanized by an overdose of MS-222 (ethyl-3-aminobenzoate methanesulfonate salt, Sigma-Aldrich, France), measured and weighted. Brain and gonads were removed and weighted and the gonado somatic index (GSI) was calculated as : (ovarian wet weight / total fish wet weight) × 100.

Tissues (or whole larvae) used for subsequent determination of mRNA levels were immediately stored at 4°C in a solution of RNAlater™ (Sigma-Aldrich, France) (10mg of tissue / 300 µl or a pool of 10 larvae / 200 µl) in order to stabilise and protect cellular RNA by immediate RNase inactivation. Samples were kept at 4°C overnight and stored at -20°C until measurement.

For subsequent determination of aromatase activity and P450aroB protein levels, tissues were rinsed in ice cold KCl (0.15 M) and homogenised in a 50 mM potassium phosphate buffer (PBS, pH 7.4), containing 1 mM PMSF, 1 mM EDTA and 20% glycerol (v/v) in a ratio of 1:2 (weight/volume). S9 fractions were isolated by centrifugation of the homogenates (10 000 g, 15 min, 4°C). For the brains, S9 were stored at -80°C until used while for the ovaries supernatants were subsequently ultra-centrifuged at 100,000 g, 90 min, 4°C (Sorvall, Discovery M120, Kendro, France) to isolate the microsomal fractions. The rationale for choosing measurement of aromatase activities in ovarian microsomes instead of S9 fractions of ovary was to avoid variation of protein content during the reproductive cycle which may lead to incorrect measurement of aromatase activities in this tissue. The microsomal pellets were resuspended in the same potassium phosphate buffer as used for the homogenisation. The total amount of proteins was determined by the method of Bradford with BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich, France) as standard (Bradford, 1976).

#### *Determination of cyp19a and cyp19b mRNA levels by bDNA assays*

Measurement of cyp19a and cyp19b mRNA levels was realised using a specific branched DNA assay (QuantiGene Expression Kit, Genospectra, USA). The branched DNA assay uses a signal-amplification nucleic acid probe assay, which measures target's mRNA directly and thus does not require neither reverse transcription of mRNA to cDNA nor amplification of the cDNA. The usefulness of this method to measure cyp19a and cyp19b mRNA levels in zebrafish has already been shown and the measures were performed as previously described by Hinfrey *et al.* (2006).

#### *Production of zebrafish brain aromatase antibodies*

The P450aroB antisera were produced in New Zealand rabbits. They were directed to the synthetic peptide CNSNGETADNRTSKE corresponding to the last 15 residues (amino acids 497-511) of the zebrafish P450aroB sequence (AF183908). Two rabbits were immunised by

intradermic injections of 500 µg purified synthetic peptide emulsified in Freund's complete adjuvant. Then they received two booster injections of purified synthetic peptide in Freund's incomplete adjuvant at 3 and 6 weeks, and one subcutaneous injection at 8 weeks. Ten days after the last injection, the rabbits were bled through the ear vein. The antiserum obtained was purified by affinity chromatography.

#### *Determination of P450aroB antibody specificity by western-blotting*

Brain or liver microsomes and cytosol (10 µg of protein) were separated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Mini-Protean II, Bio-Rad Laboratories, France) on a 10% acrylamide/bisacrylamide gel using Tris-glycine buffer, pH 8.3 as the running buffer. Prestained molecular weight markers (Prestained precision protein standard, BioRad, France) were loaded on each gel. Gels were either stained using Coomassie brilliant blue or blotted onto nitrocellulose membranes (BioRad, France). Zebrafish AroB protein were detected using anti-P450aroB antibodies as primary antibodies and goat anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated antibodies as secondary antibodies (BioRad, France). Visualization was done with an enhance chemiluminescence detection kit (ECL, Amersham, France). Liver was used as a negative control and the synthetic polypeptide as a positive control.

#### *Determination of P450aroB protein levels in brain by indirect ELISA*

On the first day, 96-well microtiter plates (Nunc Maxisorp, Nunc, Denmark) were coated at 4°C overnight with 100 µl per well of sample (100 µg of total protein/mL for ovarian microsomes and 150 µg/mL for brain S9) diluted in coating buffer (50 mM carbonate / bicarbonate, pH 9.6). On the second day, the wells were washed three times with 200 µL of washing buffer (PBS, pH 7.3, containing 0.05 % v/v of Tween20), and non specific binding sites were blocked with 200 µL of saturating buffer (2 % v/v BSA in PBS). The incubation was performed at 37°C for 1 h. Then, the wells were washed three times before addition of 100 µL of anti-P450aroB antibodies (1 : 100, in PBS containing 1% BSA). The incubation was performed at room temperature for 2 h. The wells were washed three times, 100 µL of goat anti-rabbit IgG conjugated to horseradish peroxidase (1 : 2000, PBS containing 1% BSA, Bio-Rad, France) was added to each well, and incubated at 37°C for 2 h in obscurity.

The plate was washed five times and 100 µl of tetramethyl benzidine (TMB) enzyme substrate (TMB peroxidase Substrate Kit, KPL, Dynatech, USA) was added to each well. After 30 min at room temperature, color development was stopped by addition of 50 µl of 1 M phosphoric acid (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>). Absorbance was read at 450 nm on a microtiter plate reader (EL340, Bio-Tek Instrument).

#### *Immunohistochemistry on zebrafish larvae*

After exposure, animals were anaesthetized in MS-222, fixed in PBS (pH 7.4) containing 4% of paraformaldehyde and 0.2% of picric acid for 24 h at 4°C, and entirely processed for frozen sections (12µm). Immunohistochemistry was performed as described by (Menuet *et al.*, 2005). Aromatase immunoreactivity was revealed by using a nickel intensification protocol (Shu *et al.*, 1988). Micrographs were taken on an Axioskope photomicroscope (Zeiss, Germany) equipped with a DXC-390P digital camera (Sony, Japan). Images were acquired by using the Visilog 6 software (Noesis, France) and adjusted for light and contrast by using Microsoft Photo Editor. No other alterations were made.

#### *Aromatase activity assay*

Brain and ovarian aromatase activities were measured in individual fish by the tritiated water assay modified from (Thompson and Siiteri, 1974) as described by (Hinfray *et al.*, 2006). Briefly, ovarian microsomal proteins or brain S9 fraction proteins were incubated with a complete NADPH regenerating system. The reaction started with the addition of the radioactive substrate ([1β-3H (N)]androst-4-ene-3,17-dione, specific activity = 25.3 Ci/mmol, Perkin Elmer, France), and was stopped after 1 h of incubation at 27°C by addition of chloroform. The aqueous layer was extracted twice with chloroform and once with a solution of charcoal (5%, w/v). Scintillation counting was realised in the aqueous phase with a microbeta (Perkin Elmer, France). Aromatase activity measurements were realised in duplicates for each tube. Results were expressed in fmol of estrone formed per mg of protein and per min (fmol/mg/min).

#### *Luciferase activity in Human glial cells*

Luciferase assay was performed on U251-MG cells as described by Le Page *et al.* (2006). Briefly, U251-MG glial cells were co-transfected with expression vector, cytomegalovirus-beta-galactosidase control plasmid, zebrafish ER (alpha, beta 1 or beta 2) and zebrafish AroB promoter-luciferase reporter construct. After one night, medium was replaced with fresh DMEM-F12 containing 2% charcoal/dextran, foetal calf serum (FCS), with clotrimazole or vehicle. The luciferase activities were assayed 48 hours later using the luciferase assay system (Promega, France). Beta-galactosidase activity was used to normalise transfection efficiency in all experiments. Each experiment was performed at least in triplicate.

#### *Luciferase and EROD activity in MELN cells*

The MELN cells were obtained by stable transfection of MCF-7 cells by a ERE- $\beta$ Glob-Luc-SVNeo plasmid and selected with 1 mg/ml geneticin (Balaguer *et al.*, 1999). Three days before and during chemical exposure, cell lines were maintained in DMEM without phenol red, supplemented with 3% of dextran-coated charcoal treated foetal calf serum (DCC-FCS). Cells were seeded in 96-well white opaque tissue culture plates, and left to incubate for 24 hours. Exposure to chemicals was then performed for 16 hours at 37°C in triplicate. After cells exposure, the medium was replaced by 50  $\mu$ L of DCC-FCS medium containing  $3.10^4$  M D-luciferine and the luminescence was read after 5 minutes in micro-beta Wallac microtiter plate luminometer (Microbeta, Perkin Elmer, France). Results are expressed as percent of maximal luciferase induction by estradiol.

After luminescence measurement, the media was removed and replaced by 100  $\mu$ l of cultured medium containing 5  $\mu$ M of 7-ethoxyresorufine. Kinetics of resorufine production were monitored during 15 minutes in a microplate fluorimeter (Victor<sup>2</sup>, Perkin Elmer, France) at 530 and 590 nm excitation and emission wavelengths respectively, at room temperature. In each test, TCDD ( $10^{-9}$  M) was used as a positive control. Results are expressed as percent of maximal induction observed with TCDD.

#### *Data analysis and statistics*

Differences between groups were analysed for statistical significance with a Kruskal-Wallis test and a Mann-Whitney U test. Results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD), and differences between groups were considered to be significant when  $p < 0.05$ .

## RESULTS

### *Effect of exposure to clotrimazole on aromatase in adult zebrafish*

No mortality occurred in any group during the course of the experiments, and no significant differences were observed between treatment groups for fish size, fish wet weight, or GSI (data not shown).

After 7 days of exposure to clotrimazole, *cyp19* genes expressions were measured. In solvent control (SC) and water control (WC), *cyp19b* mRNA levels in brain and ovary as well as aromatase activities in these two tissues were in accordance with previously reported data for this fish (Hinfray *et al.*, 2006) and there was no difference between SC and WC (data not shown). Similarly *aroB* expression measured in brain of fish from SC and WC was not significantly different. Therefore, data concerning aromatase expression and activities in fish from SC and WC were pooled and named SC.

In the brain of fish exposed to 4 µg/L of clotrimazole, *cyp19b* gene expression was significantly induced (1.4 fold) as compared to controls whereas at concentrations of 100 and 500 µg/L expressions were significantly reduced (about 2.6 and 1.9 fold respectively) (Fig. 1). In contrast, in the ovary, *cyp19a* gene expression was induced at all concentrations tested (about 3 fold) although at 100 µg/L the effect was not significant due to large inter-individual variability (Fig. 1).

At the enzymatic level, in clotrimazole-exposed fish, aromatase activities were significantly increased at 20 µg/L in brain and ovary compared to SC (about 1.7 and 3.7 fold respectively). In contrast, at the concentration of 500 µg/L, aromatase activities were 1.8 fold reduced in the brain (Fig. 1).

In brain, the effect of clotrimazole on aromatase was further examined by determining its effect on *aroB* protein synthesis by indirect ELISA using specific anti-*aroB* antibodies (Fig. 2). The figure 1 shows the *aroB* protein expression in the brain of SC-fish and clotrimazole-exposed fish. In the brain, P450*aroB* synthesis was significantly increased at 20 µg/L (about 1.2 fold), whereas at 500 µg/L, it was significantly reduced (about 1.25 fold) (Fig. 1).

### *Effect of clotrimazole exposure on aromatase in zebrafish larvae*

To assess the effect of clotrimazole on aromatase in zebrafish early life stages, 17 dpf old zebrafish have been exposed to 20, 100, and 500 µg/L of clotrimazole during 3 days. At 500

µg/L of clotrimazole, all larvae died. Thus, the concentration of 200 µg/L of clotrimazole was used in the exposure protocol to replace 500 µg/L. No mortality occurred at any other concentration tested.

Cyp19b gene expression was significantly enhanced by *in vivo* exposure to clotrimazole (2 fold induction at 20 µg/L), whereas no significant alteration of the cyp19a gene expression was noted (Fig. 3). In E2-exposed fish, cyp19b was strongly induced whereas no effect was observed on cyp19a expression (data not shown).

In immunohistochemistry experiments, no immunostaining of the P450aroB protein was observed in the brain of zebrafish larvae exposed to clotrimazole during 3 days. In contrast, estradiol which was used as a positive control, strongly induced the P450aroB protein synthesis in the central nervous system of larvae and more precisely in radial glial cells (Fig. 4).

#### *Effect of clotrimazole on luciferase activity in human glial cells and MELN cells*

The ability of clotrimazole to induce cyp19b expression, an estrogen regulated gene, raise the question of the estrogenicity of this molecule. Thus, we assessed its ability to induce ER-dependent luciferase activity in two different *in vitro* reporter gene assays.

In human glial cells, estradiol ( $10^{-8}$  M), used as positive control, increased the luciferase activity about 18, 5, and 14 fold compared to control in cells that transiently expressed ERalpha, ERbeta1 and ERbeta2 respectively. Besides, no induction was observed for any concentration of clotrimazole tested and for any zf-ER (Fig. 5).

In contrast, in MELN cells, clotrimazole induced dose-dependently the luciferase activity (Fig. 6). Co-exposure with clotrimazole and ICI, a pure antagonist of ER, totally blocked the luciferase induction confirming the involvement of ER in clotrimazole-induced luciferase activity (Table II). Surprisingly, co-exposure with clotrimazole and estradiol enhanced the induction of luciferase activity to a level higher than the induction observed for clotrimazole or estradiol alone suggesting that clotrimazole is not a full ER agonist (Table II). Altogether, these results suggest that clotrimazole is able to stimulate ER mediated transcription in MELN cells, but not through a direct binding of clotrimazole to the ER.

#### *Effect of clotrimazole on EROD activity in MELN cells*

Since clotrimazole has been described as an Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) agonist, we further investigated the effect of clotrimazole on EROD activity which is known to be under the control of the AhR.

EROD activity was assessed in MELN cells after overnight exposure to clotrimazole. Clotrimazole increased EROD activity dose-dependently until the concentration of  $3 \cdot 10^{-6}$  M. At the higher concentration of  $1 \cdot 10^{-5}$  M, EROD activity was clearly inhibited (Fig. 6). Coexposure with clotrimazole and alpha-naphtoflavone, a partial antagonist of the AhR, totally blocked the induction indicating that functional AhR are required (Table II). In contrast, coexposure with clotrimazole and TCDD enhanced EROD induction to a level slightly higher than the induction observed for clotrimazole or TCDD alone suggesting that clotrimazole is not a full agonist of the AhR (Table II).

## DISCUSSION

Clotrimazole, an imidazole fungicide, has been clearly demonstrated as a potent inhibitor of aromatase activity *in vitro* (Monod *et al.*, 1993; Trosken *et al.*, 2004; Hinfrey *et al.*, In press), but until now, its *in vivo* effects on aromatase expression in fish remained to be determined.

Both mRNA levels and aromatase activity measured in fish from the water and solvent control group in this study are in agreement with previous published data from non exposed female zebrafish (Hinfrey *et al.*, 2006). Moreover, the pattern of expression of cyp19 genes as well as aromatase activities are in accordance with those observed from other teleost fish, i.e. high aromatase expression/activity in neural tissue compared to gonadal tissue (Pasmanik and Callard, 1988; Dalla Valle *et al.*, 2002; Gonzalez and Piferrer, 2002).

The effects of clotrimazole on aromatase observed in our study are more complex than initially suspected. In ovary, clotrimazole exposure induced cyp19a gene expression at all the concentrations tested. It also enhanced aromatase activity at the concentration of 4 and 20  $\mu\text{g/L}$  and returned to the control level for the two highest concentrations. Ketoconazole, another imidazole compound, is also known to inhibit aromatase activity *in vitro* in human prostatic homogenates (Ayub and Levell, 1990), and in cells containing human recombinant aromatase (Stresser *et al.*, 2000; Trosken *et al.*, 2004). However, it has also been shown to induce cyp19 gene expression in H295R cells (Hilscherova *et al.*, 2004). In the ovary of fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed for 7 days to fadrozole, cyp19a gene expression was induced at all concentrations tested whereas aromatase activity was induced at low concentration and return to the control level at the highest concentration tested



(Villeneuve *et al.*, 2006). Villeneuve *et al.* (2006) suggested that the increased *cyp19a* transcript abundance in ovary was a biological compensatory effect due to the decrease in estradiol production caused by the direct inhibitory effect of fadrozole on the aromatase enzyme activity. However, exposure of female zebrafish to ATD, a steroidal aromatase inhibitor, inhibited aromatase activity in ovary without any effect on *cyp19a* gene expression (Hinfray *et al.*, 2006). Thus, it seems that the inhibition of aromatase activity may not be the cause of the *cyp19a* gene expression induction. On the opposite, the effect of clotrimazole exposure on *cyp19a* transcript abundance might explain one part of the inverted U-shaped concentration response observed for ovarian aromatase activity. The increase in *cyp19a* transcript abundance presumably resulted in an increase in functional aromatase protein in ovary. However, at the highest concentration (500 µg/L), it would appear that the increased expression of the *cyp19a* gene and/or the ability to synthesise additional enzyme was not sufficient to counteract the direct inhibitory effect of the compound on the enzyme activity. Thus, the aromatase activity response appears to reflect the interplay between a greater enzyme levels, and an increasing concentration of enzyme inhibitor. However, the exact mechanism of induction of the *cyp19a* gene expression by clotrimazole is actually unknown. Many putative responsive elements, such as steroidogenic factor 1 (SF-1, which belong to the fushi tarazu (FTZ-F1) family), aryl hydrocarbon (AhR), androgen responsive element (ARE), estrogens responsive element (ERE) or c-AMP responsive elements (CRE), have been found in the promoter region of the *cyp19a* gene (Kazeto *et al.*, 2003; Tong and Chung, 2003). Thus, we could wonder whether the effect of clotrimazole on *cyp19a* gene expression is mediated through either a direct action on the promoter region of the gene (via one of the responsive elements) or an indirect action (via the hypophysis-pituitary-gonad axis). To date, only two responsive elements are known to be functional in fish. In medaka, gonadotropin was showed to induce aromatase activity in vitellogenic follicles via an adenylate cyclase cAMP-dependent step (Nagahama *et al.*, 1991). Recently, Kanda *et al.* (2006) demonstrated that FTZ-F1 was able to activate rainbow trout *cyp19a* gene transcription. Clearly, further studies on regulation of *cyp19a* gene are required to assess the molecular mode of action of clotrimazole.

In zebrafish brain, *cyp19b* gene expression was induced at the concentration of 4 µg/L, whereas at 100 and 500 µg/L *cyp19b* expression was reduced. P450aroB protein synthesis and aromatase activity in the brain were also increased but only at the concentration of 20 µg/L, and then inhibited at the concentration of 500 µg/L. At the highest concentration tested (500 µg/L), aromatase activity as well as *cyp19b* gene expression and P450aroB protein synthesis

in brain were deeply inhibited by the treatment. In teleosts fish brain, *cyp19b* gene is known to be under the control of a positive autoregulatory feedback loop driven by estradiol, the product of aromatization (Callard *et al.*, 2001). On a molecular basis, it was recently demonstrated that this estradiol-dependent regulation involves a direct transcriptional action of ERs requiring the synergistic effect of ERE and ½ ERE in the promoter region of the *cyp19b* gene (Menuet *et al.*, 2005). Thus, it could be hypothesised that the local deprivation of estradiol due to aromatase activity inhibition in the brain by direct interaction of clotrimazole with the enzyme, led to a decreasing transcript abundance of the *cyp19b* gene. At lower concentrations of clotrimazole, increase in aromatase expression and activity were observed. A slight but not significant increase of brain aromatase activity was observed in the brain of adult female fathead minnow exposed for 21 days to two imidazole-like compounds (Ankley *et al.*, 2005). To our knowledge, this is the first report showing a significant increase of *cyp19b* gene expression, *aroB* synthesis and aromatase activity in the brain of adult fish exposed to an imidazole compound. All these results show that *in vivo* effects of clotrimazole are more complex than previously presumed. Moreover, difference between effects observed in the brain and the ovary clearly indicates that brain and ovarian aromatase are differently regulated. To confirm the capability of clotrimazole to induce aromatase, exposures at fish early life stage were conducted. Indeed, we have previously shown that aromatase B induction is a more sensitive marker of estrogens in zebrafish larvae than in adult fish. At larval stage, *cyp19a* gene expression was not significantly affected by exposure to clotrimazole while in females *cyp19a* gene expression in ovaries was induced. Such difference between adult stage and larvae stage have already been shown for estradiol, where *cyp19a* gene expression in the ovary of adult female zebrafish was strongly decreased while the expression in zebrafish larvae was not altered (Hinfrey *et al.*, 2006), a difference which might be attributed to the developmental stage of the gonads, i.e. undifferentiated gonad in 17 dpf fish and mature gonad in adult fish. In contrast to *cyp19a*, *cyp19b* gene expression was significantly increased (2 fold) at the concentration of 20 µg/L. A similar inverted U-shaped curve was observed in larvae as compared to adult. However, no inhibition of *cyp19b* gene expression was observed in zebrafish larvae, probably due to the lowest concentration tested at the larval stage. The induction of brain aromatase by clotrimazole at the transcriptional level was not observed at the translational level as observed for the natural inducer of brain aromatase (E2). It showed that clotrimazole is a weak inducer of brain aromatase and confirm results obtained at adult stage.

Further investigations were processed to tempt to determine the mechanisms of action of clotrimazole. To date, only estrogens and xeno-estrogens have been shown to induce aromatase in the brain of zebrafish larvae and these *cyp19b* gene expression inductions were ER-dependent (Kazeto *et al.*, 2004; Menuet *et al.*, 2005). Thus, we wonder whether the induction of *cyp19b* gene by clotrimazole was ER-mediated. Effect of clotrimazole was first tested on luciferase activity in two different cellular models: the MELN cells and the human glial cells. In human glial cells, clotrimazole was not able to activate luciferase activity indicating that clotrimazole is not able to up-regulate *cyp19b* expression through an ER-dependent mechanism. In MELN cells, clotrimazole induced an estrogenic response as noted by the induction of luciferase activity, and this induction was ER-dependent since co-exposure with ICI totally blocked the luciferase activity induction. In another cell type, HELN cells, clotrimazole had no effect on luciferase activity (Lemaire *et al.*, 2006). Thus, ER transactivation capacity of clotrimazole might depend on the cellular context of the assay.

Different hypothesis could be made to tempt to explain the estrogenic activity observed with clotrimazole. Indeed, clotrimazole was shown to induce the *cyp1A* mRNA transcription and EROD activity in cultured rainbow trout hepatocytes (Navas *et al.*, 2004) and in MELN cells (Fig. 6). Inhibition of clotrimazole-dependent EROD induction by alpha-naphthoflavone, a partial antagonist of AhR, showed that induction of EROD activity by clotrimazole was mediated by the AhR. Co-exposure with clotrimazole and TCDD enhanced the induction of EROD activity to a level higher than the induction observed for clotrimazole or TCDD alone, suggesting that clotrimazole is not a full AhR agonist, as previously stated by Navas *et al.* (2004). In MCF-7 cells a positive cross-talk between AhR and ER has previously been revealed (Ohtake *et al.*, 2003). Our results on MELN, cells derived from the MCF-7 cells, might suggest that clotrimazole could interact with AhR which in turn interfere with the ER to activate the transcription of the luciferase gene. To date, such positive cross-talk between AhR/Arnt and ER has only been found in MCF-7 and Ishikawa cells (Ohtake *et al.*, 2003). The absence of estrogenicity of clotrimazole in HELN or human glial cells might be explained by the absence of positive cross-talk between ER and AhR in these cell types. Whether such positive cross-talk exist in zebrafish to explain *aroB* induction is not known but a recent study indicate that TCDD is not able to induce *aroB* expression in zebrafish at both mRNA and protein levels. Another hypothesis that could be raise concerns the metabolism of clotrimazole into estrogenic metabolites. In MELN cells, clotrimazole was shown to activate EROD activity which is known to be implied in xenobiotics metabolism. Thus, in MELN cells, clotrimazole could potentially be metabolised. In human and rats, clotrimazole

has been shown to be metabolised in diverse compounds including benzophenone (Duhm *et al.*, 1974). Suzuki *et al.* (2005) have recently shown that benzophenone, and more particularly diverse hydroxybenzophenones, possess weak (benzophenone) to strong (2-hydroxybenzophenone) estrogenic activity in MCF-7 cells. This result might explain in part the estrogenic activity observed in MELN after exposure to clotrimazole, however, some studies remain to be done to determine the real capacity of metabolisation of the different cells systems, and to which extent benzophenone could be hold responsible for the estrogenic activity observed *in vitro* and *in vivo* in fish. All the results obtained in this study did not allowed us to raise a formal conclusion on the mechanism of action of clotrimazole on aroB induction.

Clotrimazole has been shown to act as an aromatase inhibitor in mammalian and fish models (Monod *et al.*, 1993; Trosken *et al.*, 2004). Our previous study on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) aromatase activity *in vitro* agreed with these results (Hinfray *et al.*, In press). In our study, clotrimazole showed to be able to induce aromatase expression / activity in zebrafish. The mechanisms by which these inductions occurred was not elucidated and not predicted based on the results of *in vitro* assays. The unexpected effect of clotrimazole presented in this study clearly demonstrates the importance of *in vivo* test to assess the effect of endocrine disrupting chemicals on aromatase and more generally on steroidogenic enzymes. The complex effects of clotrimazole, and more generally imidazole fungicides, could be link to their capability to interfere with various receptors such as AhR, and potentially with many P450 cytochrome enzymes due to their poor specific mode of fixation on the cytochrome P450 14-alpha-demethylase of fungi (Zhang *et al.*, 2002). Moreover, effects of clotrimazole on aromatase were different according to the tissue (brain or ovary) and the level of expression (mRNA, protein, or aromatase activity). Such discrepancy between effects observed on aromatase mRNA levels and on aromatase activity has already been shown in different fish species exposed to different compounds (Hinfray *et al.*, 2006; Patel *et al.*, 2006; Villeneuve *et al.*, 2006) and highlighted the need to assess effect of xenobiotics at different levels of expression (gene, protein and enzymatic activity). In accordance with the study of Villeneuve *et al.* (2006), our results did not reveal a predictive relationship between brain and ovary aromatase expression and activity that would allow a system-wide understanding of effects on aromatase based on measures in a single tissue following exposure to endocrine disrupting chemicals. Moreover, this study shows that the complex effects of endocrine disrupting chemicals required the complementarity of *in vitro* and *in vivo* assays for the assessment of their mode of action.

## REFERENCES

Andersen, H.R., Vinggaard, A.M., Rasmussen, T.H., Gjermansen, I.M., Bonefeld-Jorgensen, E.C., 2002. Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity, and aromatase activity in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol*, 179 (1), 1-12.

Ankley, G.T., Jensen, K.M., Durhan, E.J., Makynen, E.A., Butterworth, B.C., Kahl, M.D., Villeneuve, D.L., Linnam, A., Gray, L.E., Cardon, M., Wilson, V.S., 2005. Effects of two fungicides with multiple modes of action on reproductive endocrine function in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicol Sci*, 86 (2), 300-308.

Ayub, M., Levell, M.J., 1990. The inhibition of human prostatic aromatase activity by imidazole drugs including ketoconazole and 4-hydroxyandrostenedione. *Biochem Pharmacol*, 40 (7), 1569-1575.

Balaguer, P., Francois, F., Comunale, F., Fenet, H., Boussioux, A.-M., Pons, M., Nicolas, J.-C., Casellas, C., 1999. Reporter cell lines to study the estrogenic effects of xenoestrogens. *Sci Total Environ*, 233 (1-3), 47-56.

Blazquez, M., Piferrer, F., 2004. Cloning, sequence analysis, tissue distribution, and sex-specific expression of the neural form of P450 aromatase in juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Mol Cell Endocrinol*, 219 (1-2), 83-94.

Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72 248-254.

Callard, G.V., Tchoudakova, A., 1997. Evolutionary and functional significance of two CYP19 genes differentially expressed in brain and ovary of goldfish. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 61 (3-6), 387-392.

Callard, G.V., Tchoudakova, A.V., Kishida, M., Wood, E., 2001. Differential tissue distribution, developmental programming, estrogen regulation and promoter characteristics of cyp19 genes in teleost fish. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 79 (1-5), 305-314.

Chiang, E.F., Yan, Y.L., Guiguen, Y., Postlethwait, J., Chung, B., 2001a. Two Cyp19 (P450 aromatase) genes on duplicated zebrafish chromosomes are expressed in ovary or brain. *Mol Biol Evol*, 18 (4), 542-550.

Chiang, E.F., Yan, Y.L., Tong, S.K., Hsiao, P.H., Guiguen, Y., Postlethwait, J., Chung, B.C., 2001b. Characterization of duplicated zebrafish cyp19 genes. *J Exp Zool*, 290 (7), 709-714.

Dalla Valle, L., Ramina, A., Vianello, S., Belvedere, P., Colombo, L., 2002. Cloning of two mRNA variants of brain aromatase cytochrome P450 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *J Steroid Biochem Mol Biol*, 82 (1), 19-32.

Duhm, B., Medenwald, H., Puetter, J., Maul, W., Patzschke, K., Wegner, L.A., 1974. The pharmacokinetics of clotrimazole 14C. *Postgrad Med J*, 50 Suppl 1 13-16.

- Forlano, P.M., Deitcher, D.L., Myers, D.A., Bass, A.H., 2001. Anatomical distribution and cellular basis for high levels of aromatase activity in the brain of teleost fish: aromatase enzyme and mRNA expression identify glia as source. *J Neurosci*, 21 (22), 8943-8955.
- Gelinas, D., A. Pitoc, G., V. Callard, G., 1998. Isolation of a goldfish brain cytochrome P450 aromatase cDNA : mRNA expression during the seasonal cycle and after steroid treatment. *Mol Cell Endocrinol*, 138 (1-2), 81-93.
- Gonzalez, A., Piferrer, F., 2002. Characterization of aromatase activity in the sea bass: effects of temperature and different catalytic properties of brain and ovarian homogenates and microsomes. *J Exp Zool*, 293 (5), 500-510.
- Hilscherova, K., Jones, P.D., Gracia, T., Newsted, J.L., Zhang, X., Sanderson, J.T., Yu, R.M., Wu, R.S., Giesy, J.P., 2004. Assessment of the effects of chemicals on the expression of ten steroidogenic genes in the H295R cell line using real-time PCR. *Toxicol Sci*, 81 (1), 78-89.
- Hinfray, N., Palluel, O., Turies, C., Cousin, C., Porcher, J.M., Brion, F., 2006. Brain and gonadal aromatase as potential targets of endocrine disrupting chemicals in a model species, the zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Toxicol*, 21 (4), 332-337.
- Hinfray, N., Porcher, J.M., Brion, F., In press. Inhibition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) P450 aromatase activities in brain and ovarian microsomes by various environmental substances. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*.
- Kanda, H., Okubo, T., Omori, N., Niihara, H., Matsumoto, N., Yamada, K., Yoshimoto, S., Ito, M., Yamashita, S., Shiba, T., Takamatsu, N., 2006. Transcriptional regulation of the rainbow trout CYP19a gene by FTZ-F1 homologue. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 99 (2-3), 85-92.
- Kavlock, R.J., Daston, G.P., DeRosa, C., Fenner-Crisp, P., Gray, L.E., Kaattari, S., Lucier, G., Luster, M., Mac, M.J., Maczka, C., Miller, R., Moore, J., Rolland, R., Scott, G., Sheehan, D.M., Sinks, T., Tilson, H.A., 1996. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ Health Perspect*, 104 Suppl 4, 715-740.
- Kazeto, Y., Ijiri, S., Place, A.R., Zohar, Y., Trant, J.M., 2001. The 5'-flanking regions of CYP19A1 and CYP19A2 in zebrafish. *Biochem Biophys Res Commun*, 288 (3), 503-508.
- Kazeto, Y., Goto-Kazeto, R., Place, A.R., Trant, J.M., 2003. Aromatase expression in zebrafish and channel catfish brains: changes in transcript abundance associated with the reproductive cycle and exposure to endocrine disrupting chemicals. *Fish Physiol Biochem*, 28 (1-4), 29-32.
- Kazeto, Y., Place, A.R., Trant, J.M., 2004. Effects of endocrine disrupting chemicals on the expression of CYP19 genes in zebrafish (*Danio rerio*) juveniles. *Aquat Toxicol*, 69 (1), 25-34.
- Kishida, M., Callard, G.V., 2001. Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in zebrafish (*Danio rerio*) brain and ovary are differentially programmed and estrogen regulated during early development. *Endocrinology*, 142 (2), 740-750.

Laville, N., Balaguer, P., Brion, F., Hinfrey, N., Casellas, C., Porcher, J.-M., Ait-Aissa, S., 2006. Modulation of aromatase activity and mRNA by various selected pesticides in the human choriocarcinoma JEG-3 cell line. *Toxicology*, 228 (1), 98-108.

Lemaire, G., Mnif, W., Mauvais, P., Balaguer, P., Rahmani, R., 2006. Activation of [alpha]- and [beta]-estrogen receptors by persistent pesticides in reporter cell lines. *Life Sci*, 79 (12), 1160-1169.

Le Page, Y., Scholze, M., Kah, O., Pakdel, F., 2006. Assessment of xenoestrogens using three distinct estrogen receptors and the zebrafish brain aromatase gene in a highly responsive glial cell system. *Environ Health Perspect*, 114 (5), 752-758.

Lephart, E.D., 1996. A review of brain aromatase cytochrome P450. *Brain Res Brain Res Rev*, 22 (1), 1-26.

Mason, J.I., Carr, B.R., Murry, B.A., 1987. Imidazole antimycotics: selective inhibitors of steroid aromatization and progesterone hydroxylation. *Steroids*, 50 (1-3), 179-189.

Menuet, A., Pellegrini, E., Brion, F., Gueguen, M.M., Anglade, I., Pakdel, F., Kah, O., 2005. Expression and estrogen-dependent regulation of the zebrafish brain aromatase gene. *J Comp Neurol*, 485 (4), 304-320.

Miller, W.L., 1988. Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr Rev*, 9 (3), 295-318.

Monod, G., De Mones, A., Fostier, A., 1993. Inhibition of ovarian microsomal aromatase and follicular estradiol suppression by imidazole fungicides in rainbow trout. *Mar Environ Res*, 35 153-157.

Monteiro, P.R.R., Reis-Henriques, M.A., Coimbra, J., 2000. Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit in vitro ovarian steroidogenesis in the flounder (*Platichthys flesus L.*). *Aquat Toxicol*, 48 (4), 549-559.

Nagahama, Y., Matsuhisa, A., Iwamatsu, T., Sakai, N., Fukada, S., 1991. A mechanism for the action of pregnant mare serum gonadotropin on aromatase activity in the ovarian follicle of the medaka, *Oryzias latipes*. *J Exp Zool*, 259 (1), 53-58.

Navas, J.M., Chana, A., Herradon, B., Segner, H., 2004. Induction of cytochrome P4501A (CYP1A) by clotrimazole, a non-planar aromatic compound. Computational studies on structural features of clotrimazole and related imidazole derivatives. *Life Sci*, 76 (6), 699-714.

Ohtake, F., Takeyama, K., Matsumoto, T., Kitagawa, H., Yamamoto, Y., Nohara, K., Tohyama, C., Krust, A., Mimura, J., Chambon, P., Yanagisawa, J., Fujii-Kuriyama, Y., Kato, S., 2003. Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature*, 423 (6939), 545-550.

OSPAR, 2005. OSPAR background document on clotrimazole. OSPAR, ISBN : 1-9004426-38-7.

- Pasmanik, M., Callard, G.V., 1988. Changes in brain aromatase and 5 alpha-reductase activities correlate significantly with seasonal reproductive cycles in goldfish (*Carassius auratus*). *Endocrinology*, 122 1349-1356.
- Patel, M.R., Scheffler, B.E., Wang, L., Willett, K.L., 2006. Effects of benzo(a)pyrene exposure on killifish (*Fundulus heteroclitus*) aromatase activities and mRNA. *Aquat Toxicol*, 77 (3), 267-278.
- Roberts, P.H., Thomas, K.V., 2006. The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment. *Sci Total Environ*, 356 (1-3), 143-153.
- Sanderson, J.T., Boerma, J., Lansbergen, G.W.A., van den Berg, M., 2002. Induction and Inhibition of Aromatase (CYP19) Activity by Various Classes of Pesticides in H295R Human Adrenocortical Carcinoma Cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 182 (1), 44-54.
- Segner, H., Caroll, K., Fenske, M., Janssen, C.R., Maack, G., Pascoe, D., Schafers, C., Vandenberg, G.F., Watts, M., Wenzel, A., 2003. Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA project. *Ecotox Environ Safe*, 54 (3), 302-314.
- Shu, S.Y., Ju, G., Fan, L.Z., 1988. The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system. *Neurosci Lett*, 85 (2), 169-171.
- Simpson, E.R., Mahendroo, M.S., Means, G.D., Kilgore, M.W., Hinshelwood, M.M., Graham-Lorence, S., Amarneh, B., Ito, Y., Fisher, C.R., Michael, M.D., et al., 1994. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev*, 15 (3), 342-355.
- Stresser, D.M., Turner, S.D., McNamara, J., Stocker, P., Miller, V.P., Crespi, C.L., Patten, C.J., 2000. A High-Throughput Screen to identify inhibitors of aromatase (CYP19). *Anal Biochem*, 284 (2), 427-430.
- Tchoudakova, A., Callard, G.V., 1998. Identification of multiple CYP19 genes encoding different cytochrome P450 aromatase isozymes in brain and ovary. *Endocrinology*, 139 (4), 2179-2189.
- Thomas, K.V., Hilton, M.J., 2004. The occurrence of selected human pharmaceutical compounds in UK estuaries. *Mar Pollut Bull*, 49 (5-6), 436-444.
- Thompson, E.A., Jr., Siiteri, P.K., 1974. Utilization of oxygen and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate by human placental microsomes during aromatization of androstenedione. *J Biol Chem*, 249 (17), 5364-5372.
- Tong, S.-K., Chung, B.-c., 2003. Analysis of zebrafish *cyp19* promoters. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 86 (3-5), 381-386.
- Trant, J.M., Lehrter, J., Gregory, T., Nunez, S., Wunder, J., 1997. Expression of cytochrome P450 aromatase in the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 61 (3-6), 393-397.



Trant, J.M., Gavasso, S., Ackers, J., Chung, B.C., Place, A.R., 2001. Developmental expression of cytochrome P450 aromatase genes (CYP19a and CYP19b) in zebrafish fry (*Danio rerio*). *J Exp Zool*, 290 (5), 475-483.

Trosken, E.R., Scholz, K., Lutz, R.W., Volkel, W., Zarn, J.A., Lutz, W.K., 2004. Comparative assessment of the inhibition of recombinant human CYP19 (aromatase) by azoles used in agriculture and as drugs for humans. *Endocr Res*, 30 (3), 387-394.

Villeneuve, D.L., Knoebl, I., Kahl, M.D., Jensen, K.M., Hammermeister, D.E., Greene, K.J., Blake, L.S., Ankley, G.T., 2006. Relationship between brain and ovary aromatase activity and isoform-specific aromatase mRNA expression in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquat Toxicol*, 76 (3-4), 353-368.

Vinggaard, A.M., Hnida, C., Breinholt, V., Larsen, J.C., 2000. Screening of selected pesticides for inhibition of CYP19 aromatase activity in vitro. *Toxicol in Vitro*, 14 (3), 227-234.

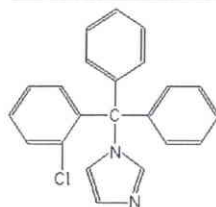
World Health Organisation, 2002. Global Assessment of the States-of-the-Science of Endocrine Disruptors.

Zhang, W., Ramamoorthy, Y., Kilicarslan, T., Nolte, H., Tyndale, R.F., Sellers, E.M., 2002. Inhibition of cytochromes P450 by antifungal imidazole derivatives. *Drug Metab Dispos*, 30 (3), 314-318.

Table I: Structure and physico-chemical properties of clotrimazole. MW: molecular weight, Log Kow: partition coefficient octanol-water, BCF: bioconcentration factor.

---

Structure



---

Molecular formula	C <sub>22</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>2</sub>
CAS number	23593-75-1
MW (g/mol)	344.84
Log Kow	4.1
Water solubility (mg/L at 25°C)	0.49
BCF for fish	610
Half life in the environment (days)	> 60

---

Table II: Effect of clotrimazole alone or in co-exposure with over substances on luciferase and EROD activity in MELN cells. Luciferase activity was expressed as a percent of the maximal response observed with estradiol. EROD activity was expressed as a percent of the maximal response observed with TCDD. SC : solvent control, ANF : alpha-naphtoflavone, Clo : clotrimazole, E2 : estradiol, ICI : ICI 182-780, TCDD : 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Results are expressed as mean  $\pm$  SD. Different letters indicate significant different values compared to respective SC (Student's-t-test,  $p < 0.05$ ).

	<b>Luciferase</b> (% E2 max)		<b>EROD</b> (% TCDD max)
SC	18.2 $\pm$ 0.7 <i>a</i>	SC	17.1 $\pm$ 1.9 <i>a</i>
E2 (10 <sup>-8</sup> M)	100.0 $\pm$ 2.8 <i>b</i>	TCDD (10 <sup>-9</sup> M)	100.0 $\pm$ 4.2 <i>b</i>
E2 (10 <sup>-8</sup> M) + ICI	1.6 $\pm$ 0.3 <i>c</i>	Clo (3.10 <sup>-6</sup> M)	118.0 $\pm$ 6.7 <i>c</i>
Clo (10 <sup>-5</sup> M)	56.5 $\pm$ 5.7 <i>d</i>	ANF (10 <sup>-5</sup> M)	0.6 $\pm$ 1.9 <i>d</i>
Clo (10 <sup>-5</sup> M) + ICI	1.7 $\pm$ 0.1 <i>c</i>	Clo (3.10 <sup>-6</sup> M) + ANF (10 <sup>-5</sup> M)	0.0 $\pm$ 0.1 <i>d</i>
ICI	1.9 $\pm$ 0.2 <i>c</i>	Clo (3.10 <sup>-6</sup> M) + TCDD (10 <sup>-9</sup> M)	152.8 $\pm$ 7.9 <i>e</i>
Clo (10 <sup>-5</sup> M) + E2 (10 <sup>-8</sup> M)	179.9 $\pm$ 4.5 <i>e</i>		

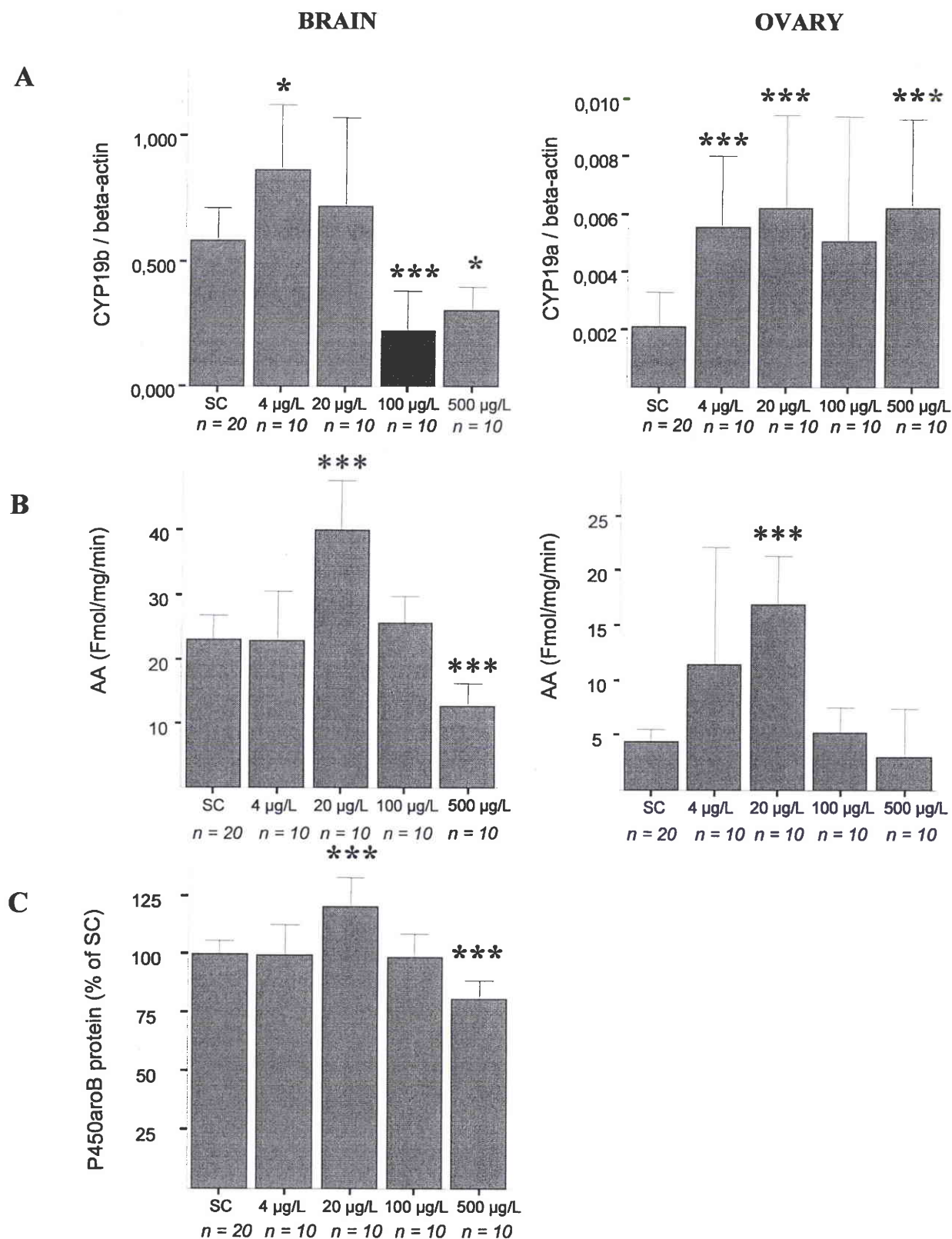


Figure 1 : Effect of a 7 days exposure to clotrimazole on cyp19 genes expression (A), aromatase activity (B) and P450aroB protein synthesis (C) in brain and gonads of adult female zebrafish. cyp19 genes expression was normalised by the expression of the beta-actin gene in the same sample. Results are express as mean  $\pm$  SD. SC : solvent control, n : number of fish analysed per treatment. \* and \*\*\* indicate significant difference between treated fish and solvent control fish (Kruskall-Wallis test, and Mann-Whitney U test, \*  $p < 0.05$  and \*\*\*  $p < 0.01$ ).

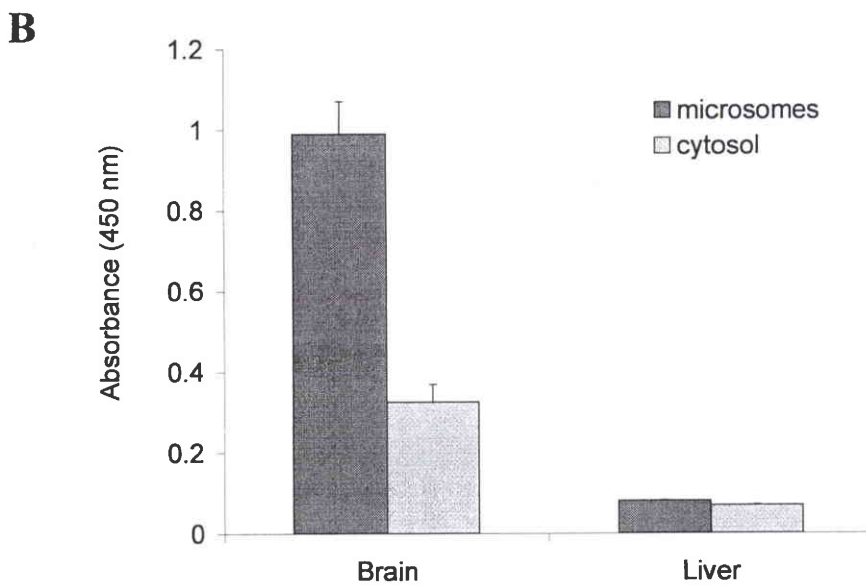
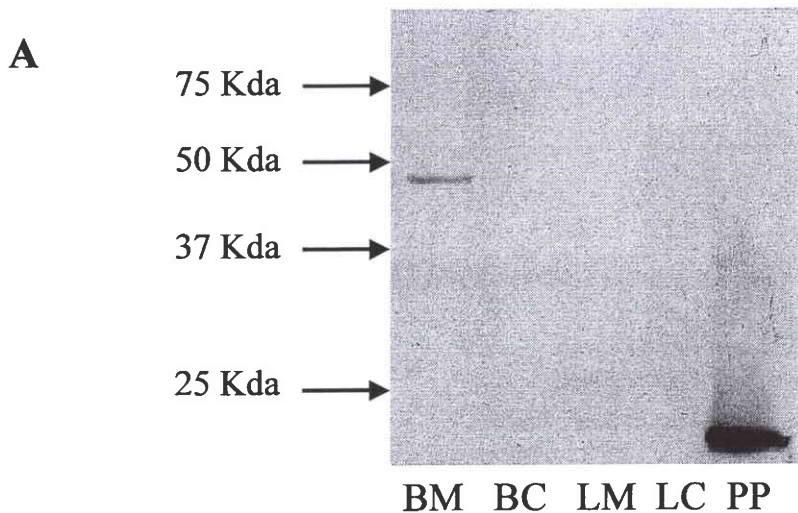


Figure 2 : Determination of anti-P450aromataseB antibodies specificity. (A) Immunoblotting analysis of brain and liver fractions (microsomes and cytosol) with anti-zebrafish P450aroB antibodies. For SDS-PAGE, 10  $\mu$ g of proteins from each sample and 5  $\mu$ g of polypeptide were applied to each lane. The P450aroB protein is 47 Kda and detected in the brain microsomes. BM : brain microsomes, BC : brain cytosol, LM : liver microsomes, LC : liver cytosol, PP : polypeptide. (B) ELISA analysis of brain and liver fractions (microsomes and cytosol). P450aroB protein was localised mainly in the brain microsomes. No P450aroB protein was detected in the liver fractions.

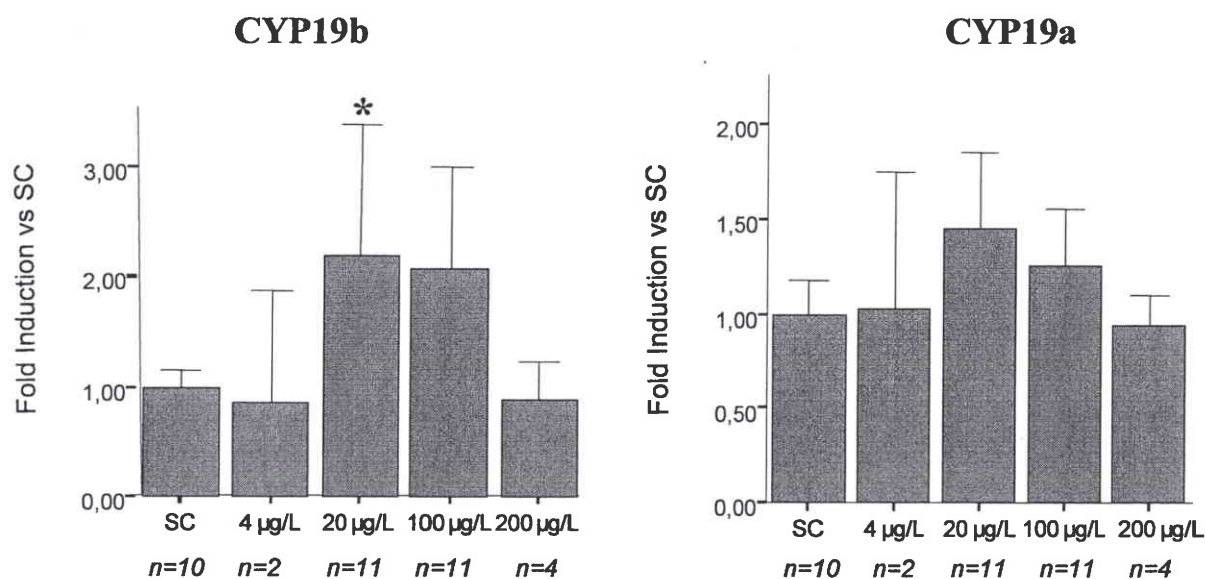


Figure 3: Effect of clotrimazole exposure on *cyp19* genes expression in zebrafish larvae. Larvae were exposed for 72 h between 17 and 20 days post fertilisation. Results are express as mean  $\pm$  SD and in fold induction compare to solvent control. SC : solvent control, n : number of pool of ten larvae analysed per treatment. \* indicate significant difference between treated fish and solvent control fish (Kruskall-Wallis test, and Mann-Whitney U test,  $p < 0.05$ ).

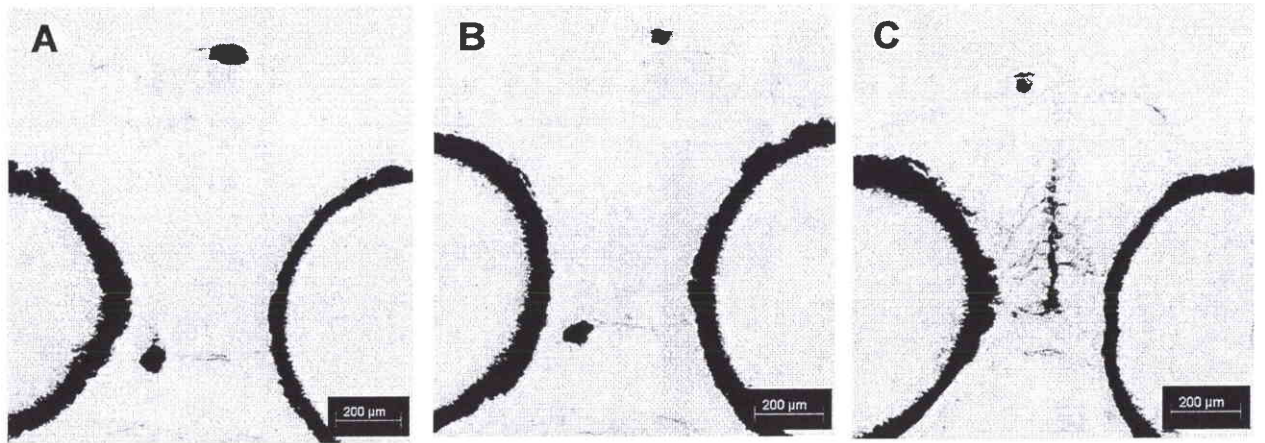


Figure 4: Effect of clotrimazole exposure on P450aroB protein synthesis in zebrafish larvae brain. Zebrafish larvae were exposed for 72 h between 17 and 20 days post fertilisation. A : brain of a solvent control larvae, B : brain of a zebrafish larvae exposed to 20 µg/L of clotrimazole, C : brain of a zebrafish larvae exposed to 10 nM of estradiol as a positive control. Immunostaining was observed in radial glial cells.

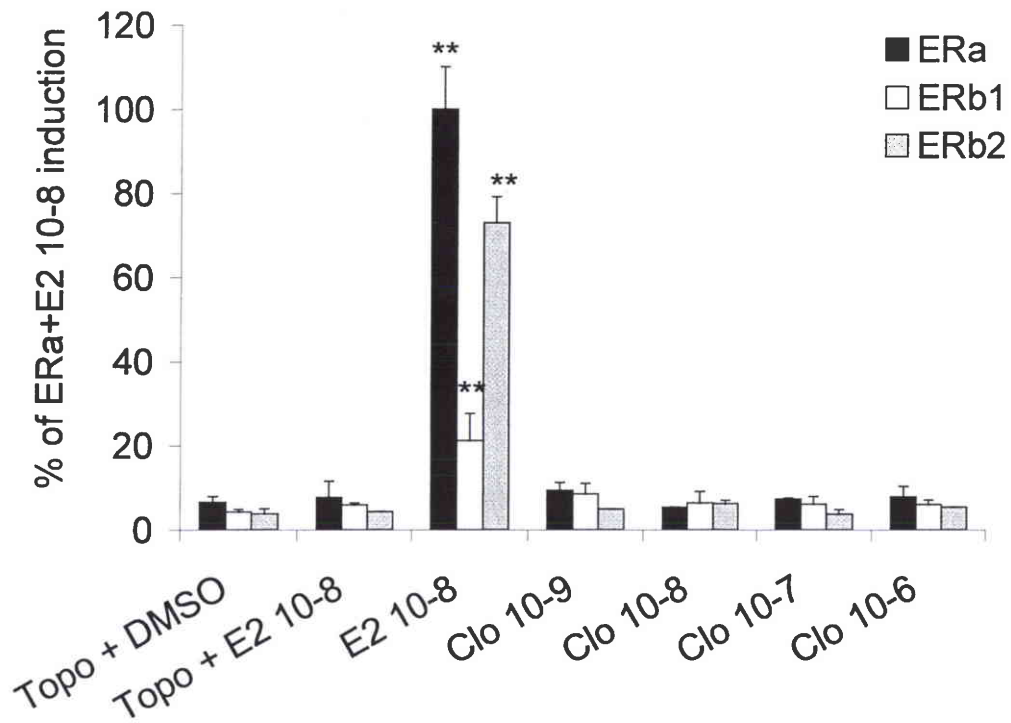


Figure 5: Effect of estradiol (E2) and clotrimazole (Clo) on luciferase activity in U251-MG glial cells. U251-MG cells were co-transfected with expression vector, cytomegalovirus-beta-galactosidase control plasmid, zebrafish estrogens receptors (ER alpha, beta 1 or beta 2) and zebrafish AroB promoter-luciferase reporter construct. \*\* indicate significant difference between treated fish and solvent control fish (Kruskall-Wallis test, and Mann-Whitney U test,  $p < 0.01$ ).



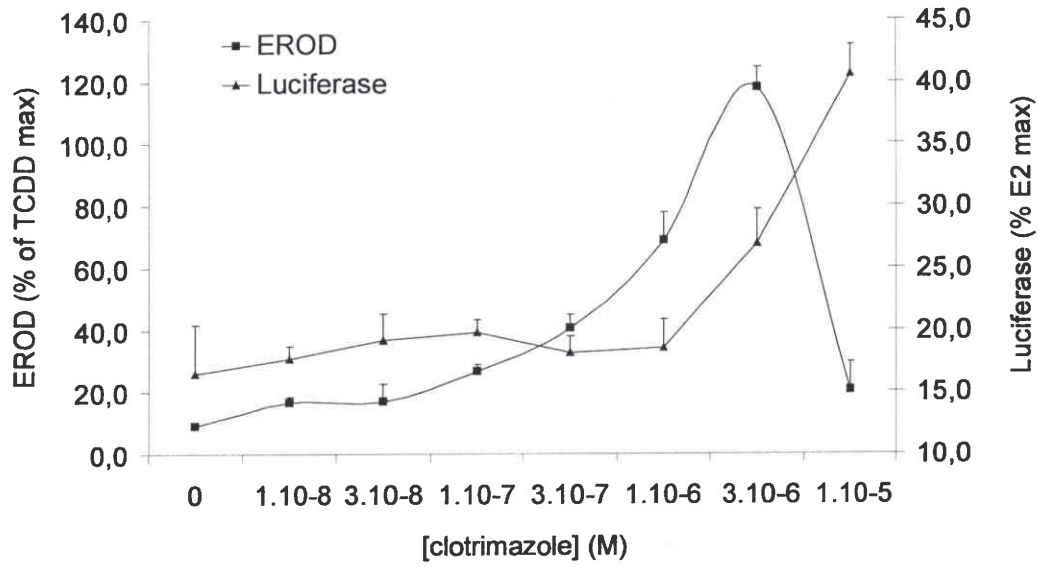
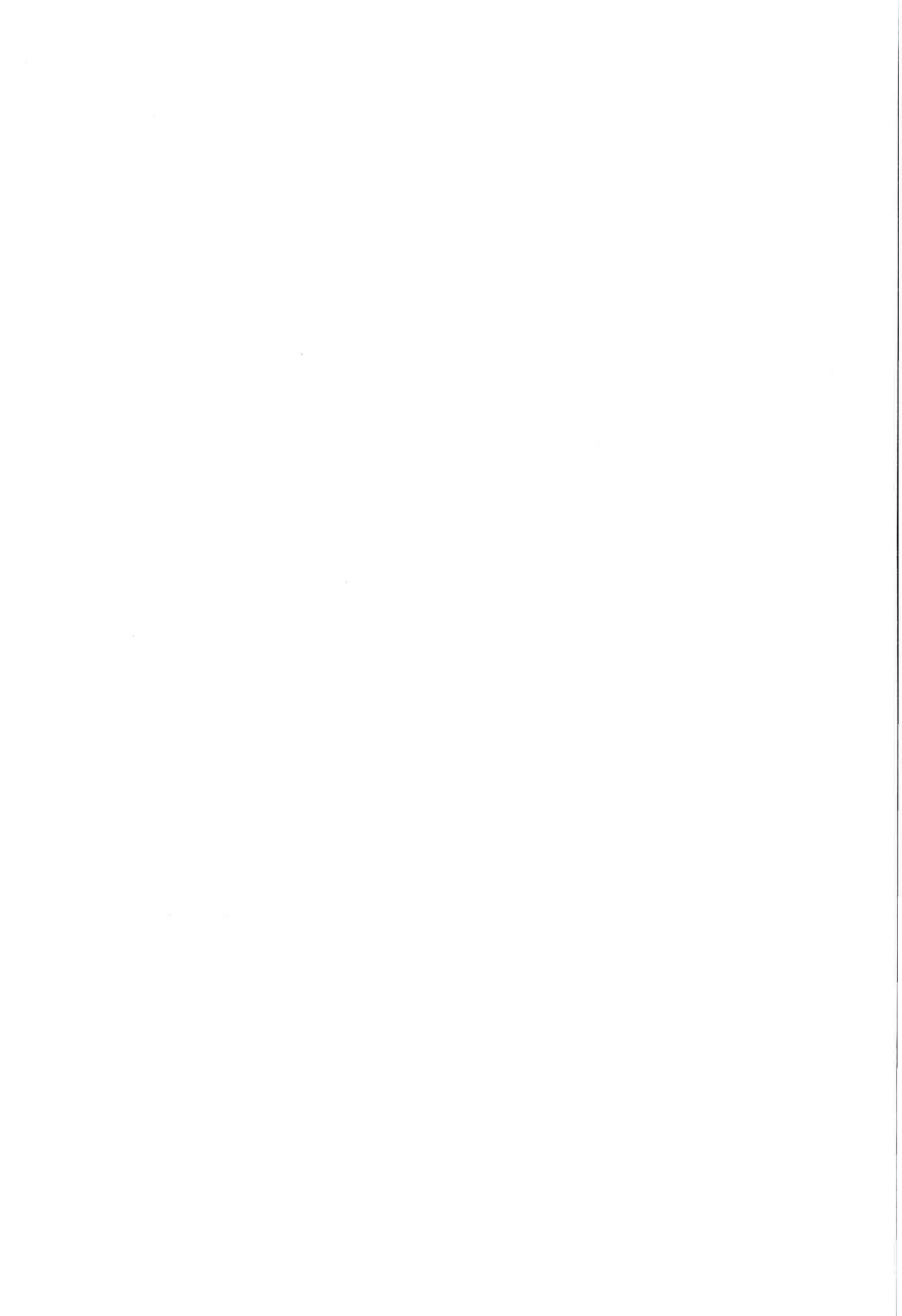


Figure 6: Effect of clotrimazole on luciferase and EROD activities in MELN cells. MELN cells are cells which stably express ERE-luciferase under the control of endogenous hERalpha. Luciferase activity was expressed as a percentage of the maximal response observed with E2. EROD activity was expressed as a percentage of the maximal response observed with TCDD.



## **Article 4**



## **Effect of nonylphenol on steroidogenic genes expression in zebrafish (*Danio rerio*)**

Hinfray N.<sup>1</sup>, Kah O.<sup>2</sup>, Palluel O.<sup>1</sup>, Piccini B.<sup>1</sup>, Porcher J.M.<sup>1</sup>, Pakdel F.<sup>2</sup>, Brion F<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup> Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques, Direction des Risques Chroniques, Unité d'évaluation des risques écotoxicologiques, BP 2, 60550 Verneuil-en-Halatte, France

<sup>2</sup> Endocrinologie Moléculaire de la Reproduction, Unité mixte de recherche 6026, Centre national de la recherche scientifique, Université de Rennes 1, 35042 Rennes, France

\* Corresponding author. Tel.: +33 (0)3 44 55 65 12; Fax: +33 (0)3 44 55 67 67

E-mail address: [Francois.Brion@ineris.fr](mailto:Francois.Brion@ineris.fr)

## ABSTRACT

Effects of endocrine disrupting chemicals on the expression of steroidogenic enzyme genes have received little attention so far, yet they are potentially major targets for sexual disruption. Among the steroidogenic enzymes, 17 $\alpha$ -hydroxylase/C17,20-lyase (P450c17) and aromatase (P450aro) are two crucial enzymes for steroid production. P450c17 is a key enzyme in the production of androgens and P450aro catalyses the irreversible conversion of androgens to estrogens which are key regulators of development and reproduction. In this study, we first investigated the effects of the natural oestrogen estradiol (E2) on brain and gonadal cyp17 and cyp19 genes expressions in a model fish species, the zebrafish (*Danio rerio*) in order to gain further information into the molecular mode of action of this compound on steroidogenic pathways. To determine whether xeno-estrogens compounds could elicit similar response to E2, we tested the effect of ethynilestradiol (EE2, 10 nM) and graded concentrations of the alkylphenolic compound nonylphenol (NP, 20, 100, and 500  $\mu$ g/L). Our results showed that E2 (10 nM) induced cyp19b gene expression in the brain of males but not in females, and inhibited cyp17 gene expression in the testis and cyp19a gene expression in the ovaries. At larval stage, E2 strongly triggered aromatase B expression at both gene and protein level. In the brain, EE2 and NP induced brain cyp19b expression in a dose-dependent manner in males but not in females. At larval stages, these induction of cyp19b in the brain led to a *de novo* synthesis of P450aroB in radial glial cells. In the gonads, EE2 and NP inhibited cyp19a gene expression in the ovary and slightly inhibited cyp17 gene expression in the testis. Taken together, this study provides new information concerning the molecular mechanism of action of (xeno)-estrogens on the steroidogenic pathways in both brain and gonads, which rise further question about the endocrine and physiological consequences for the organisms.

## INTRODUCTION

In vertebrates, the biosynthesis of steroid hormones in the gonadal and adrenal tissues requires coordinated expression and sequential actions of a series of steroidogenic enzymes. One of the enzymes critical to steroidogenesis is cytochrome P450c17 (CYP17), which is an enzyme possessing both 17 $\alpha$ -hydroxylase and 17, 20-lyase activities. The 17 $\alpha$ -hydroxylase activity converts pregnenolone and progesterone to 17 $\alpha$ -hydroxypregnenolone and 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone, respectively, while the 17, 20-lyase activity cleaves the C17, 20 bond to convert 17 $\alpha$ -hydroxypregnenolone to dehydroepiandrosterone (DHEA) or 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone to androstenedione. These metabolites are important precursors for the production of gonadal androgens or estrogens and adrenal cortisol in vertebrates (Payne, 1990; Conley and Bird, 1997; Nagahama, 1997). The gonads and the adrenal glands are the main established sites for P450c17 expression. In teleost fish, P450c17 gene expression has been studied predominantly in the gonads, and the cDNA has been isolated from the ovary or testis in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Sakai *et al.*, 1992), the Japanese eel *Anguilla japonica* (Kazeto *et al.*, 2000), the grouper *Epinephelus coioides* (Lee *et al.*, 2002), the fathead minnow *Pimephales promelas* (Halm *et al.*, 2003), the rice field eel *Monopterus albus* (Yu *et al.*, 2003) and the zebrafish *Danio rerio* (Wang and Ge, 2004). More recently, P450c17 has been demonstrated to be expressed in other tissues such as the brain (Yu *et al.*, 2003; Wang and Ge, 2004).

Cytochrome P450aromatase (P450aro) is also a crucial steroidogenic enzyme since it catalyzes the rate limiting step of conversion of androgens to estrogens which are key regulators involved in development, differentiation and homeostasis of many target organs (Simpson *et al.*, 1994). In fish, aromatase has been shown to be mainly expressed in two tissues, the brain and the ovary. Although there exist only one *cyp19* gene with multiple tissue-specific promoters in the human genome, two structurally and functionally distinct P450aromatase isoforms which are products of two separate *cyp19* genes, *cyp19a* and *cyp19b*, have been identified in many teleosts fish (Gelinias *et al.*, 1998; Tchoudakova and Callard, 1998; Kishida and Callard, 2001; Dalla Valle *et al.*, 2002). *Cyp19b* is the predominant neural form and is expressed at particularly high levels when compared to *cyp19a* which is the predominant ovarian form (Tchoudakova and Callard, 1998; Chiang *et al.*, 2001; Blazquez and Piferrer, 2004).

Due to the crucial role of androgens and estrogens, the enzymes involved in their synthesis are of critical endocrine significance. Although there exist evidence that steroids such as E2 are able to have pronounced effects on gonadal and brain steroidogenesis in fish by altering the steady state levels of several steroidogenic genes (Gelinias *et al.*, 1998; Govoroun *et al.*, 2001; Kazeto *et al.*, 2004; Hinfray *et al.*, 2006), there is a need to gain deeper understanding on the molecular effect of estrogens and xeno-estrogens on the expression of genes related to reproduction in different organs.

There is a need to understand the molecular effects of xenoestrogens on the expression of genes related to reproduction and in different organs of fish. The main purpose of this study was therefore to assess the effects of both estradiol, ethinylestradiol and nonylphenol on *cyp17* and *cyp19* genes expression in both brain and gonads of adult male and female zebrafish and to determine to which extent these steroidogenic genes could represent potential markers of exposure to estrogenic compounds.

## MATERIALS AND METHODS

### *Fish origin and maintenance*

Adult zebrafish (*Danio rerio*) were purchased from a commercial fish farm (Les serres aquatiques, France). They were maintained in 150-L tanks supplied with fully aerated water from a header tank containing osmosed water mixed with local tap water (1/1, v/v) to give a conductivity of 300  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Water was maintained at a temperature of  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ . Fish were fed daily with freshly hatched *artemia sp.* and commercial flake food (Tetramin Pro, Melle, Germany) and submitted to 14-hours light / 10-hours dark photoperiod.

In our breeding unit, wild type zebrafish were allowed to reproduce, and fertilised eggs were harvested. Larvae were maintained in semi-static conditions until 8 days post fertilization (dpf) and then transferred in 15 L glass tank continuously supplied with aerated water until experiments. Water was kept at a temperature of  $28,0 \pm 0,3^\circ\text{C}$ . Larvae were fed with commercial food adapted to their age: Infusil (Europrix, France) and Sera Micron (Sera, Deutschland) between 4 dpf and 17 dpf.

### *Exposure of adult zebrafish*



Adult zebrafish were exposed for 7 days to 10 nM of 17- $\beta$ -estradiol (E2) as a positive control; to 10 nM of 17- $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2), to 20, 100 and 500  $\mu$ g/L of a nonylphenol mixture (NP) (Fluka, France), or to solvent alone (DMSO, 0.004 % v/v). Exposures were realised in 4-L tanks under semi-static conditions with a total renewal of the water every day. Water was maintained at a temperature of  $24.1 \pm 1.6^\circ\text{C}$  and fish kept under a 14-hours light / 10-hours dark photoperiod. Each concentration was tested in duplicate separated tanks, each replicate containing 5 males and 5 females (N = 10 fish).

At the end of the exposure period, fish were euthanized by an overdose of MS-222 (ethyl-3-aminobenzoate methanesulfonate salt, Sigma-Aldrich, France), measured and weighted. Brain and gonads were removed and weighted and the gonado somatic index (GSI) was calculated as (ovarian wet weight / total fish wet weight)  $\times$  100. Tissues were immediately stored at  $4^\circ\text{C}$  in a solution of RNAlater<sup>TM</sup> (Sigma-Aldrich, France) (10mg of tissue / 300  $\mu$ l) in order to stabilise and protect cellular RNA by immediate RNase inactivation. Samples were kept at  $4^\circ\text{C}$  overnight and stored at  $-20^\circ\text{C}$  until measurement.

#### *Exposure of zebrafish larvae*

Zebrafish larvae of 17 dpf were exposed to E2 (10 nM), to EE2 (10 nM), to NP (20, 100 and 200  $\mu$ g/L), or to solvent alone (DMSO, 0.15 % v/v) for 3 days. Each experimental group was constituted of 20 zebrafish larvae exposed in 100 ml of water (with or without contaminant). One half of the water was renewed every day. At the end of the exposure period, larvae were euthanized. For subsequent mRNA level determination, fish were kept overnight at  $4^\circ\text{C}$  in a solution of RNAlater<sup>TM</sup> (a pool of 10 larvae / 200  $\mu$ l), and stored at  $-20^\circ\text{C}$  until measurement. For subsequent immunohistochemistry experiments, exposures were performed as described above but zebrafish larvae were exposed for 7 days between 4 dpf and 11 dpf. At the end of the exposure period exposure, zebrafish larvae were euthanized, fixed in PBS (pH 7.4) containing 4% paraformaldehyde and 0.2% picric acid for 24 h at  $4^\circ\text{C}$ , and entirely processed for frozen sections (12 $\mu$ m).

#### *Determination of cyp19a, cyp19b and cyp17 mRNA levels by bDNA assay*

For measurement of mRNA levels, an alternative method of RT-PCR was used. This method is the branched DNA assay (QuantiGene Expression Kit, Genospectra, USA). It uses a signal-

amplification nucleic acid probe assay, which measures mRNA directly and thus does not require neither reverse transcription of mRNA to cDNA nor amplification of the cDNA. The bDNA assays were performed as described by (Hinfray *et al.*, 2006). The specific probes for each gene were designed according to the cyp19a, cyp19b and cyp17 mRNA sequences (gene bank accession number AF183906 for zf cyp19a, AF183908 for zf cyp19b and AY281362 for zf cyp17). Expression of the three genes were normalised to the housekeeping gene, zf  $\beta$ -actin (gene bank accession number NM131031).

#### *Immunohistochemistry on zebrafish larvae*

Immunohistochemistry was performed as described by (Menuet *et al.*, 2005) using specific antibodies against zebrafish P450aromataseB (Hinfray *et al.*, In prep). Aromatase immunoreactivity was revealed by using a nickel intensification protocol (Shu *et al.*, 1988). The specificity of the staining was controlled by processing adjacent sections without primary antibody, with the preimmune serum, and with the antibody preabsorbed with the synthetic peptide (CNSNGETADNRTSKE; 1 mg/ml) .

#### *Photomicrograph production*

Micrographs were taken on an Axioskope photomicroscope (Zeiss, Germany) equipped with a DXC-390P digital camera (Sony, Japan). Images were acquired by using the Visilog 6 software and adjusted for light and contrast by using Microsoft Photo Editor. No other alterations were made.

#### *Data analysis and statistics*

Differences between groups were analysed for statistical significance with a Kruskal-Wallis test and a Mann-Whitney U test. Results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD), and differences between groups were considered to be significant if  $p < 0.05$ .

## **RESULTS**

### *Effect of exposure to E2 on steroidogenic genes expression in brain and gonads of adult zebrafish*

In control male and female zebrafish, measurement of mRNA levels of the three steroidogenic genes showed that they were all expressed in the brain and the gonads (Fig.1). In the brain, the pattern of expression of cyp19a, cyp19b and cyp17 genes was similar between males and females. In males and females, levels of cyp19b expression were about 40 fold higher than cyp17 and cyp19a expression. In the gonads, the pattern of expression was different between males and females : cyp17 was the predominantly expressed gene, followed by cyp19a in the ovary or cyp19b in the testis (Fig.1).

The effect of E2 on the expression of these three genes was assessed. In adult female zebrafish, E2 exposure had no effect neither on cyp19b expression in the brain nor on cyp19a and cyp17 expressions (Fig.1). In males, E2 exposure significantly induced (2 fold) cyp19b gene expression in the brain (Fig.1). In the ovary, cyp19a gene expression was dramatically (27 fold) inhibited by E2 exposure while other steroidogenic genes expressions were not modified (Fig.1). In the testis, only cyp17 gene expression was perturbed by E2 exposure. The cyp17 gene expression was highly inhibited by a factor 8 as compared to control (Fig.1).

Based on this first experiment describing the regulation of steroidogenic genes in brain and gonads by E2, it was decided to further study the effects of EE2 and NP on cyp19b gene expression only in the brain of males and females, cyp19a gene expression only in the ovaries, and cyp17 gene expression only in the testis.

#### *Effect of exposure to EE2 and NP on steroidogenic genes expression in brain and gonads of adult zebrafish*

At the end of the exposure period, a significant decrease in female GSI was observed in EE2 and NP 500 µg/L groups compared to solvent control (data not shown).

EE2 (10 nM) significantly induced the cyp19b gene expression in the brain of males but not in females (Fig.2). In the same way, in the brain of males, cyp19b gene expression was induced dose-dependently by NP whereas in the brain of female no significant alteration of the expression was noted (Fig.2).

In the ovary, cyp19a gene expression was strongly inhibited by EE2 (Fig.3A). At the highest concentration of NP cyp19a gene expression was also deeply inhibited in the ovary but the inhibition was not statistically significant ( $p = 0.052$ ) (Fig.3A).

In the testis, EE2 significantly reduced the expression of cyp17 gene (Fig.3B). NP exposure lead to apparent cyp17 expression increase in the testis at 20 and 100 µg/L while a two fold

decrease was measured in the testis from fish exposed to the highest concentration but the inhibitory effect was not significant (Fig.3B).

#### *Effect of exposure to E2, EE2 and NP in zebrafish larvae*

At the concentration of 500 µg/L of NP, all larvae died after one day of exposure. Thus, the concentration of 200 µg/L was added to the exposure protocol to replace 500 µg/L. At this concentration, no mortality was observed.

Whatever the substance or the concentration tested, there was no effect on *cyp19a* gene expression (Fig.4). In contrast, E2 and EE2 strongly induced *cyp19b* gene expression (about 16 and 10 fold respectively) (Fig.4). *Cyp19b* gene expression was also enhanced by exposure to NP at all concentrations tested, however, compared to E2 and EE2, it was only a 3 fold induction (Fig. 4). Moreover, coexposure of zebrafish larvae with E2, EE2 or NP and ICI, a pure antagonist of the ER, partially or totally blocked the *cyp19b* induction (Fig.5). Immunohistochemistry experiments revealed that zebrafish exposure to E2 (10 nM), EE2 (10 nM) and NP (100 µg/L) lead to induction of AroB protein synthesis in radial glial cells (Fig.6). Thus, the inductions of the *cyp19b* gene in zebrafish larvae led to *de novo* synthesis of P450aromataseB protein in the central nervous system of zebrafish larvae.

## **DISCUSSION**

#### *Cyp17 and cyp19 genes expression in adult zebrafish*

*Cyp19a* and *cyp19b* genes expressions were detected in brain, ovary and testis of adult zebrafish. In the ovary, *cyp19a* mRNA level was higher compared to *cyp19b* whereas *cyp19b* expression was predominant in the brain as previously shown for zebrafish (Kishida and Callard, 2001; Hinfrey *et al.*, 2006), sea bass (Blazquez and Piferrer, 2004), tilapia (Kwon *et al.*, 2001), or rainbow trout (Dalla Valle *et al.*, 2002). On the contrary, in the testis, *cyp19b* was more expressed than *cyp19a* which agreed with the study of Sawyer *et al.* (2006). In the testis of tilapia, only *cyp19b* expression was detected (Chang *et al.*, 2005). However, in zebrafish testis, some studies found no difference between the expressions of the two genes (Trant *et al.*, 2001; Fenske and Segner, 2004).

*Cyp17*, as measured by the bDNA assay, was detected in brain and gonadal tissues of adult male and female zebrafish which is in agreement with previously reported *cyp17* gene

expression measured by RT-PCR (Wang and Ge, 2004). Even if most of the studies on *cyp17* expression in fish focus only on the gonads (Sakai *et al.*, 1992; Kobayashi *et al.*, 1998; Kazeto *et al.*, 2000; Nakamura *et al.*, 2005), *cyp17* mRNA transcripts were also detected in the brain of fathead minnow (Halm *et al.*, 2003). Consistent with studies in fish, we also detected a predominant *cyp17* gene expression in the ovary and testis compared to brain suggesting that zebrafish gonads are the major expression sites of P450c17 (Halm *et al.*, 2003; Wang and Ge, 2004). Moreover, *cyp17* was less expressed than *cyp19* in the brain, but was the most expressed steroidogenic gene in ovary and testis.

#### *Effect of E2, EE2 and NP on cyp19b in the brain*

In males, E2 (2.7 µg/L) and EE2 (2.9 µg/L) triggered *cyp19b* gene expression in the brain. In the same way, NP induced *cyp19b* expression in the brain of males in a dose-dependent manner but concentration necessary to achieve the same induction as EE2 was about 160 fold higher (500 µg/L), indicating that NP is a weak estrogenic chemical, compared to the natural and the synthetic estrogens, E2 and EE2. In the brain of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*), NP was shown to induce *cyp19b* expression and ER (alpha and beta) gene expression after 7 days of exposure to concentrations between 5 and 15 µg/L (Meucci and Arukwe, 2006). At larval stages, zebrafish *cyp19b* was also induced by exposure to E2, EE2 and NP, and these induction required functional ER. Natural (E2) and synthetic (EE2) estrogens as well as NP have previously been shown to enhance *cyp19b* expression in zebrafish larvae exposed in similar conditions (Kazeto *et al.*, 2003; Kazeto *et al.*, 2004; Hinfrey *et al.*, 2006). Moreover, *cyp19b* induction by the three substances lead to *de novo* synthesis of P450aroB protein in the brain of zebrafish larvae as demonstrated by immunohistochemistry. In teleost fish brain, estradiol is known to exert a positive regulation on *cyp19b* gene (Callard *et al.*, 2001). On a molecular basis, it was recently demonstrated that this estradiol dependent regulation involves a direct transcriptional action of ERs requiring the synergistic effect of ERE and ½ ERE in the promoter region of the CYP19b gene (Menuet *et al.*, 2005). Taken together, our results suggest that EE2 and NP affects *cyp19b* expression at the gene and protein levels in a similar manner to the natural estrogen E2. In contrast to males, neither E2, EE2 nor NP induced *cyp19b* expression in females brain. This difference may results from higher concentrations of estrogens in the brain of females compared to males, but this hypothesis need to be tested.

Unlike birds and mammals where P450aro is expressed in neurons (Balthazart and Ball, 1998), in at least three species of teleost fish, P450aroB synthesis appears to be restricted to radial glial cells (Forlano *et al.*, 2001; Menuet *et al.*, 2003; Menuet *et al.*, 2005). These cells are involved in neuronal migration (Parnavelas and Nadarajah, 2001), and recent studies indicated that they also give birth to neurons which use the radial glial cell process to migrate in deeper brain layers (Noctor *et al.*, 2002; Anthony *et al.*, 2004; Pellegrini *et al.*, accepted). Given that estradiol is well-known for its organizational, neurotrophic and neuroprotective effects affecting proliferation, apoptosis, and migration and differentiation of neurons (Garcia-Segura *et al.*, 1999; Behl, 2002; Stokes *et al.*, 2004) and the fact that periventricular proliferative zone of the adult brain correlates well with aromatase expression (Zupanc and Clint, 2003), it has been suggested that the local production of estrogens could modulate adult neurogenesis in fish (Pellegrini *et al.*, accepted). Thus, perturbations of aromatase expression by xeno-estrogens such as EE2 and NP may be expected to interfere with important process regulated by estrogens in the brain.

#### *Effect of E2, EE2 and NP on cyp19a in the ovary*

In females gonads, cyp19a gene expression was strongly inhibited by the exposure to E2 (2.7 µg/L), confirming the down-regulation of ovarian aromatase expression by E2 in this fish species (Hinfrey *et al.*, 2006; Sawyer *et al.*, 2006). Interestingly, the two xeno-estrogens tested in this study also inhibited cyp19a expression. The negative effect of NP on cyp19a in the ovary of adult zebrafish found in this study is in agreement with recently published data in zebrafish (Alberti *et al.*, 2005) and in the hermaphroditic fish rivulus (*Rivulus marmoratus*) (Lee *et al.*, 2006). Depending on the experiment, cyp19a inhibition occurred for concentrations ranging from 250 µg/L to 500 µg/L and for duration of exposure ranging from 4 to 11 days, indicating a rapid effect of E2 and EE2 on aromatase gene in the gonads. Further, we demonstrated that the cyp19a inhibition by E2 led to inhibition of functional protein, the ovarian aromatase activities being inhibited as well (Hinfrey *et al.*, 2006). It can be hypothesised that exposure of females to high concentrations of estrogens or estrogen-like compounds would probably reduce their estrogen synthesis in a manner that they could maintain their internal hormonal environment stable (Martin-Skilton *et al.*, 2006). Aromatase inhibition is one mechanism by which they could achieve this. However, the exact mechanism of action of estrogens and xeno-estrogens on aromatase in the gonad is actually unknown. In contrast to the effects observed at adult stage, E2, EE2 and NP had no effect on cyp19a

expression in zebrafish at larval stage. Kazeto et al. (2004) found an inhibitory effect of EE2 on *cyp19a* expression in zebrafish larvae but at the concentration of 29 µg/L. Thus, inhibition of *cyp19a* expression are observed only for adult (and not for larvae), suggesting a higher sensitivity of *cyp19a* expression to xeno-estrogens at adult stages when gonads are differentiated.

In our study, *cyp19a* inhibition by E2, EE2 and NP (500 µg/L) was also accompanied by a decrease in females GSI. Van den Belt et al. (2004) underscored a decrease in zebrafish female GSI after 3 weeks of exposure to 2.27 µM (504 µg/L) of NP. It is interesting to note that similar concentration of E2 (10 nM) leads to an alteration of oogenesis in female fish, the ovaries of exposed fish being composed mainly of immature oocytes (Brion *et al.*, 2000; Van den Belt *et al.*, 2004), or characterised by several atretic follicles and no mature or graafian follicles (Miles-Richardson *et al.*, 1999). It can be suggested that the effects seen at histological level are mediated, at least in part, by inhibition of aromatase transcripts and aromatase activities.

Aromatase and estrogens plays a crucial role in development, reproduction and behaviour. Perturbations of aromatase expression / activity may be expected to interfere with diverse endocrine processes such as sexual differentiation or vitellogenesis. In the gonad, aromatase was proposed as a key step in the process of ovarian differentiation as in undifferentiated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) its inhibition resulted in a complete masculinization of an all female population (Guiguen *et al.*, 1999). Moreover, during the female reproductive cycle, ovarian secretion of estradiol controls the hepatic synthesis of vitellogenin, a phospholipoprotein corresponding to the major precursor of embryonic trophics reserves (Flouriot *et al.*, 1997). In female fathead minnow, inhibitions of brain aromatase and circulating estradiol and vitellogenin concentration by exposure to fadrozole were linked to marked alterations in ovarian histology and a reduced fecundity of fish (Ankley *et al.*, 2002). Therefore, inhibition of aromatase expression by xeno-estrogens in zebrafish, may be expected to have effects on fish reproduction process.

#### *Effect of E2, EE2 and NP on cyp17 in the testis*

In male fish exposed to E2, the testicular expression of *cyp19a* and *cyp19b* were not altered which was in agreement with the absence of effect of E2 on these genes in zebrafish testis (Sawyer *et al.*, 2006). In contrast, *cyp17* gene expression was deeply and significantly inhibited by E2 and EE2 but not by NP although *cyp17* was decreased. The absence of

significant effect might be due to the fact that in the testis of control fish from the NP experiment, expression level of *cyp17* gene was two times lower than in the testis of control males from the E2 experiment. The reason for such a difference in expression level from control group from one experiment to another is not known, and a deeper characterisation of the expression of this gene in control fish should be recommended. In the postdifferentiating testis of rainbow trout, 10 days of exposure to E2 (20 mg/kg of diet) decreased *cyp17* mRNA levels (Govoroun *et al.*, 2001). In juvenile rainbow trout, a fast and marked decrease of steady-state mRNA levels of *cyp17* gene was observed in the testis after an 8 days exposure to EE2 (20 mg/kg of diet) (Baron *et al.*, 2005). The mechanism leading to inhibition of *cyp17* expression in the testis is actually unknown. In rainbow trout, Govoroun *et al.* (2001) suggested that regulation of *cyp17* gene expression could be mediated via the alteration of the expression of the steroidogenic factor-1 (SF-1) gene. In the testis of foetal rats exposed *in utero* to diethylstilbestrol (a synthetic estrogen) or 4-octylphenol (xeno-estrogen), *cyp17* gene expression inhibition in Leydig cells correlates with inhibition of SF-1 gene (Majdic *et al.*, 1996; Majdic *et al.*, 1997). Moreover, in mammals, SF-1 gene has been shown to be essential for transcriptional control of most of the steroidogenic cytochromes P450 (Payne and Youngblood, 1995; Morohashi and Omura, 1996). Thus, SF1 would be a good candidate for such a role in fish. However, to our knowledge, no other study has been made to confirm this hypothesis.

The decrease in *cyp17* gene expression probably result in a reduced androgens production in the testis, and therefore of 11-oxygenated androgens. Sex steroids, especially androgens, play important roles in spermatogenesis in teleost fishes (Nagahama, 1994). 11-ketotestosterone, a potent androgen in teleost fish, has been shown to induce the entire process of spermatogenesis from premitotic spermatogonia to spermatozoa *in vitro* in japanese eel testis in culture (Miura *et al.*, 1991). In amago salmon, 11-ketotestosterone production increases during the progression of spermatogenesis (Sakai *et al.*, 1989). The inhibition of androgen synthesis through the decrease in *cyp17* mRNA may, therefore, have an impact on spermatogenesis in fish, and thus on their reproduction capacity.

## CONCLUSION

The present study described the expression and the perturbation of multiples steroidogenic genes in brain and gonads of male and female zebrafish. We confirm that both genes are expressed in brain and gonads but expression patterns were different depending on the tissue



and the sex. Moreover, we showed for the first time that the natural estrogen, E2, as well as the synthetic estrogen, EE2, and the alkylphenolic compound NP, can affect multiple steroidogenic genes expression in the central nervous system of fish (cyp19b) as well as in the gonadal tissue (cyp19a in the ovary and cyp17 in the testis). Taken together, these results confirm that endocrine disrupting chemicals can affect steroidogenesis via multiples ways and that aromatase and P450c17 are potentially relevant biomarkers of exposure of fish to xeno-estrogens compounds.

## REFERENCES

- Alberti, M., Kausch, U., Haindl, S., Seifert, M., 2005. Gene Expression Analysis for Exposure to Estrogenic Substances. *Acta Hydrochim Hydrobiol*, 33 (1), 38-44.
- Ankley, G.T., Kahl, M.D., Jensen, K.M., Hornung, M.W., Korte, J.J., Makynen, E.A., Leino, R.L., 2002. Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicol Sci*, 67 (1), 121-130.
- Anthony, T.E., Klein, C., Fishell, G., Heintz, N., 2004. Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system. *Neuron*, 41 (6), 881-890.
- Balthazart, J., Ball, G.F., 1998. New insights into the regulation and function of brain estrogen synthase (aromatase). *Trends Neurosci*, 21 (6), 243-249.
- Baron, D., Fostier, A., Breton, B., Guiguen, Y., 2005. Androgen and estrogen treatments alter steady state messengers RNA (mRNA) levels of testicular steroidogenic enzymes in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Mol Reprod Dev*, 71 (4), 471-479.
- Behl, C., 2002. Oestrogen as a neuroprotective hormone. *Nat Rev Neurosci*, 3 (6), 433-442.
- Blazquez, M., Piferrer, F., 2004. Cloning, sequence analysis, tissue distribution, and sex-specific expression of the neural form of P450 aromatase in juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Mol Cell Endocrinol*, 219 (1-2), 83-94.
- Brion, F., Paluzzi, X., Babut, M., Garric, J., Maddix, S., Migeon, B., Noury, P., Porcher, J.-M., Thybaud, E., Tyler, C., Flammarion, P., 2000, Estrogenic effects in chub (*Leuciscus cephalus*) : induction of vitellogenin and alterations in testicular structure, 3<sup>rd</sup> SETAC WORLD Congress, Brighton, 21-25 may.
- Callard, G.V., Tchoudakova, A.V., Kishida, M., Wood, E., 2001. Differential tissue distribution, developmental programming, estrogen regulation and promoter characteristics of cyp19 genes in teleost fish. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 79 (1-5), 305-314.
- Chang, X., Kobayashi, T., Senthilkumaran, B., Kobayashi-Kajura, H., Sudhakumari, C.C., Nagahama, Y., 2005. Two types of aromatase with different encoding genes, tissue

distribution and developmental expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Gen Comp Endocrinol*, 141 (2), 101-115.

Chiang, E.F., Yan, Y.L., Guiguen, Y., Postlethwait, J., Chung, B., 2001. Two Cyp19 (P450 aromatase) genes on duplicated zebrafish chromosomes are expressed in ovary or brain. *Mol Biol Evol*, 18 (4), 542-550.

Conley, A.J., Bird, I.M., 1997. The role of cytochrome P450 17 alpha-hydroxylase and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the integration of gonadal and adrenal steroidogenesis via the delta 5 and delta 4 pathways of steroidogenesis in mammals. *Biol Reprod*, 56 (4), 789-799.

Dalla Valle, L., Ramina, A., Vianello, S., Belvedere, P., Colombo, L., 2002. Cloning of two mRNA variants of brain aromatase cytochrome P450 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *J Steroid Biochem Mol Biol*, 82 (1), 19-32.

Fenske, M., Segner, H., 2004. Aromatase modulation alters gonadal differentiation in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol*, 67 105-126.

Flouriot, G., Pakdel, F., Ducouret, B., Ledrean, Y., Valotaire, Y., 1997. Differential regulation of two genes implicated in fish reproduction: vitellogenin and estrogen receptor genes. *Mol Reprod Dev*, 48 (3), 317-323.

Forlano, P.M., Deitcher, D.L., Myers, D.A., Bass, A.H., 2001. Anatomical distribution and cellular basis for high levels of aromatase activity in the brain of teleost fish: aromatase enzyme and mRNA expression identify glia as source. *J Neurosci*, 21 (22), 8943-8955.

Garcia-Segura, L.M., Wozniak, A., Azcoitia, I., Rodriguez, J.R., Hutchison, R.E., Hutchison, J.B., 1999. Aromatase expression by astrocytes after brain injury: implications for local estrogen formation in brain repair. *Neuroscience*, 89 (2), 567-578.

Gelinas, D., A. Pitoc, G., V. Callard, G., 1998. Isolation of a goldfish brain cytochrome P450 aromatase cDNA : mRNA expression during the seasonal cycle and after steroid treatment. *Mol Cell Endocrinol*, 138 (1-2), 81-93.

Govoroun, M., McMeel, O.M., Mecherouki, H., Smith, T.J., Guiguen, Y., 2001. 17beta-estradiol treatment decreases steroidogenic enzyme messenger ribonucleic acid levels in the rainbow trout testis. *Endocrinology*, 142 (5), 1841-1848.

Guiguen, Y., Baroiller, J.-F., Ricordel, M.-J., Iseki, K., McMeel, O.M., Martin, S.A.M., Fostier, A., 1999. Involvement of estrogens in the process of sex differentiation in two fish species: The rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and a tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Mol Reprod Dev*, 54 (Issue 2), 154-162.

Halm, S., Kwon, J.Y., Rand-Weaver, M., Sumpter, J.P., Pounds, N., Hutchinson, T.H., Tyler, C.R., 2003. Cloning and gene expression of P450 17[alpha]-hydroxylase, 17,20-lyase cDNA in the gonads and brain of the fathead minnow *Pimephales promelas*. *Gen Comp Endocrinol*, 130 (3), 256-266.

Hinfray, N., Palluel, O., Turies, C., Cousin, C., Porcher, J.M., Brion, F., 2006. Brain and gonadal aromatase as potential targets of endocrine disrupting chemicals in a model species, the zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Toxicol*, 21 (4), 332-337.

Hinfray, N., Aït-Aïssa, S., Le Page, Y., Gouze, M.E., Porcher, J.M., Pakdel, F., Brion, F., In prep. Effect of clotrimazole on brain and gonadal aromatase in zebrafish (*Danio rerio*).

Kazeto, Y., Ijiri, S., Todo, T., Adachi, S., Yamauchi, K., 2000. Molecular Cloning and Characterization of Japanese Eel Ovarian P450c17 (CYP17) cDNA. *Gen Comp Endocrinol*, 118 (1), 123-133.

Kazeto, Y., Goto-Kazeto, R., Place, A.R., Trant, J.M., 2003. Aromatase expression in zebrafish and channel catfish brains: changes in transcript abundance associated with the reproductive cycle and exposure to endocrine disrupting chemicals. *Fish Physiol Biochem*, 28 (1-4), 29-32.

Kazeto, Y., Place, A.R., Trant, J.M., 2004. Effects of endocrine disrupting chemicals on the expression of CYP19 genes in zebrafish (*Danio rerio*) juveniles. *Aquat Toxicol*, 69 (1), 25-34.

Kishida, M., Callard, G.V., 2001. Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in zebrafish (*Danio rerio*) brain and ovary are differentially programmed and estrogen regulated during early development. *Endocrinology*, 142 (2), 740-750.

Kobayashi, T., Nakamura, M., Kajiura-Kobayashi, H., Young, G., Nagahama, Y., 1998. Immunolocalization of steroidogenic enzymes (P450scc, P450c17, P450arom, and 3 $\beta$ -HSD) in immature and mature testes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cell Tissue Res*, 292 (3), 573-577.

Kwon, J.Y., McAndrew, B.J., Penman, D.J., 2001. Cloning of brain aromatase gene and expression of brain and ovarian aromatase genes during sexual differentiation in genetic male and female Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Mol Reprod Dev*, 59 (4), 359-370.

Lee, S.T., Lam, T.J., Tan, C.H., 2002. Increased 21-hydroxylase and shutdown of C17,20 lyase activities in testicular tissues of the grouper (*Epinephelus coioides*) during 17[ $\alpha$ ]-methyltestosterone-induced sex inversion. *Gen Comp Endocrinol*, 126 (3), 298-309.

Lee, Y.-M., Seo, J.S., Kim, I.-C., Yoon, Y.-D., Lee, J.-S., 2006. Endocrine disrupting chemicals (bisphenol A, 4-nonylphenol, 4-tert-octylphenol) modulate expression of two distinct cytochrome P450 aromatase genes differently in gender types of the hermaphroditic fish *Rivulus marmoratus*. *Biochem Biophys Res Commun*, 345 (2), 894-903.

Majdic, G., Sharpe, R.M., O'Shaughnessy, P.J., Saunders, P.T., 1996. Expression of cytochrome P450 17 $\alpha$ -hydroxylase/C17-20 lyase in the fetal rat testis is reduced by maternal exposure to exogenous estrogens. *Endocrinology*, 137 (3), 1063-1070.

Majdic, G., Sharpe, R.M., Saunders, P.T., 1997. Maternal oestrogen/xenoestrogen exposure alters expression of steroidogenic factor-1 (SF-1/Ad4BP) in the fetal rat testis. *Mol Cell Endocrinol*, 127 (1), 91-98.

- Martin-Skilton, R., Thibaut, R., Porte, C., 2006. Endocrine alteration in juvenile cod and turbot exposed to dispersed crude oil and alkylphenols. *Aquat Toxicol*, 78 (Supplement 1), S57-S64.
- Menuet, A., Anglade, I., Le Guevel, R., Pellegrini, E., Pakdel, F., Kah, O., 2003. Distribution of aromatase mRNA and protein in the brain and pituitary of female rainbow trout: Comparison with estrogen receptor alpha. *J Comp Neurol*, 462 (2), 180-193.
- Menuet, A., Pellegrini, E., Brion, F., Gueguen, M.M., Anglade, I., Pakdel, F., Kah, O., 2005. Expression and estrogen-dependent regulation of the zebrafish brain aromatase gene. *J Comp Neurol*, 485 (4), 304-320.
- Meucci, V., Arukwe, A., 2006. Transcriptional modulation of brain and hepatic estrogen receptor and P450arom isoforms in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) after waterborne exposure to the xenoestrogen, 4-nonylphenol. *Aquat Toxicol*, 77 (2), 167-177.
- Miles-Richardson, S.R., Kramer, V.J., Fitzgerald, S.D., Render, J.A., Yamini, B., Barbee, S.J., Giesy, J.P., 1999. Effects of waterborne exposure of 17 [beta]-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Aquat Toxicol*, 47 (2), 129-145.
- Miura, T., Yamauchi, K., Takahashi, H., Nagahama, Y., 1991. Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in vitro in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88 (13), 5774-5778.
- Morohashi, K.I., Omura, T., 1996. Ad4BP/SF-1, a transcription factor essential for the transcription of steroidogenic cytochrome P450 genes and for the establishment of the reproductive function. *Faseb J*, 10 (14), 1569-1577.
- Nagahama, Y., 1994. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *Int J Dev Biol*, 38 (2), 217-229.
- Nagahama, Y., 1997. 17 alpha,20 beta-dihydroxy-4-pregnen-3-one, a maturation-inducing hormone in fish oocytes: mechanisms of synthesis and action. *Steroids*, 62 (1), 190-196.
- Nakamura, I., Evans, J.C., Kusakabe, M., Nagahama, Y., Young, G., 2005. Changes in steroidogenic enzyme and steroidogenic acute regulatory protein messenger RNAs in ovarian follicles during ovarian development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen Comp Endocrinol*, 144 (3), 224-231.
- Noctor, S.C., Flint, A.C., Weissman, T.A., Wong, W.S., Clinton, B.K., Kriegstein, A.R., 2002. Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. *J Neurosci*, 22 (8), 3161-3173.
- Parnavelas, J.G., Nadarajah, B., 2001. Radial glial cells. are they really glia? *Neuron*, 31 (6), 881-884.
- Payne, A.H., 1990. Hormonal regulation of cytochrome P450 enzymes, cholesterol side-chain cleavage and 17 alpha-hydroxylase/C17-20 lyase in Leydig cells. *Biol Reprod*, 42 (3), 399-404.

Payne, A.H., Youngblood, G.L., 1995. Regulation of expression of steroidogenic enzymes in Leydig cells. *Biol Reprod*, 52 (2), 217-225.

Pellegrini, E., Mouriec, K., Anglade, I., Menuet, A., Le Page, Y., Gueguen, M.M., Mamignon, M.H., Brion, F., Pakdel, F., Kah, O., accepted. Aromatase identifies radial cells as progenitor cells in the ventricular layer of the forebrain in adult zebrafish. *J. Comp Neurol*.

Sakai, N., Ueda, H., Suzuki, N., Nagahama, Y., 1989. Steroid production by amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*) testes at different development stages. *Gen Comp Endocrinol*, 75 (2), 231-240.

Sakai, N., Tanaka, M., Adachi, S., Miller, W.L., Nagahama, Y., 1992. Rainbow trout cytochrome P-450c17 (17[alpha]-hydroxylase/17,20-lyase) cDNA cloning, enzymatic properties and temporal pattern of ovarian P-450c17 mRNA expression during oogenesis. *FEBS Lett*, 301 (1), 60-64.

Sawyer, S.J., Gerstner, K.A., Callard, G.V., 2006. Real-time PCR analysis of cytochrome P450 aromatase expression in zebrafish: Gene specific tissue distribution, sex differences, developmental programming, and estrogen regulation. *Gen Comp Endocrinol*, 142 (2), 108-117.

Shu, S.Y., Ju, G., Fan, L.Z., 1988. The glucose oxidase-DAB-nickel method in peroxidase histochemistry of the nervous system. *Neurosci Lett*, 85 (2), 169-171.

Simpson, E.R., Mahendroo, M.S., Means, G.D., Kilgore, M.W., Hinshelwood, M.M., Graham-Lorence, S., Amarneh, B., Ito, Y., Fisher, C.R., Michael, M.D., et al., 1994. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev*, 15 (3), 342-355.

Stokes, E.A., Lonergan, W., Weber, L.P., Janz, D.M., Poznanski, A.A., Balch, G.C., Metcalfe, C.D., Grober, M.S., 2004. Decreased apoptosis in the forebrain of adult male medaka (*Oryzias latipes*) after aqueous exposure to ethinylestradiol. *Comp Biochem Physiol C-Toxicol Pharmacol*, 138 (2), 163-167.

Tchoudakova, A., Callard, G.V., 1998. Identification of multiple CYP19 genes encoding different cytochrome P450 aromatase isozymes in brain and ovary. *Endocrinology*, 139 (4), 2179-2189.

Trant, J.M., Gavasso, S., Ackers, J., Chung, B.C., Place, A.R., 2001. Developmental expression of cytochrome P450 aromatase genes (CYP19a and CYP19b) in zebrafish fry (*Danio rerio*). *J Exp Zool*, 290 (5), 475-483.

Van den Belt, K., Berckmans, P., Vangenechten, C., Verheyen, R., Witters, H., 2004. Comparative study on the in vitro/in vivo estrogenic potencies of 17[beta]-estradiol, estrone, 17[alpha]-ethinylestradiol and nonylphenol. *Aquat Toxicol*, 66 183-195.

Wang, Y., Ge, W., 2004. Cloning of zebrafish ovarian P450c17 (CYP17, 17[alpha]-hydroxylase/17, 20-lyase) and characterization of its expression in gonadal and extra-gonadal tissues. *Gen Comp Endocrinol*, 135 (2), 241-249.

Yu, H., Cheng, H., Guo, Y., Xia, L., Zhou, R., 2003. Alternative splicing and differential expression of P450c17 (CYP17) in gonads during sex transformation in the rice field eel. *Biochem Biophys Res Commun*, 307 (1), 165-171.

Zupanc, G.K., Clint, S.C., 2003. Potential role of radial glia in adult neurogenesis of teleost fish. *Glia*, 43 (1), 77-86.

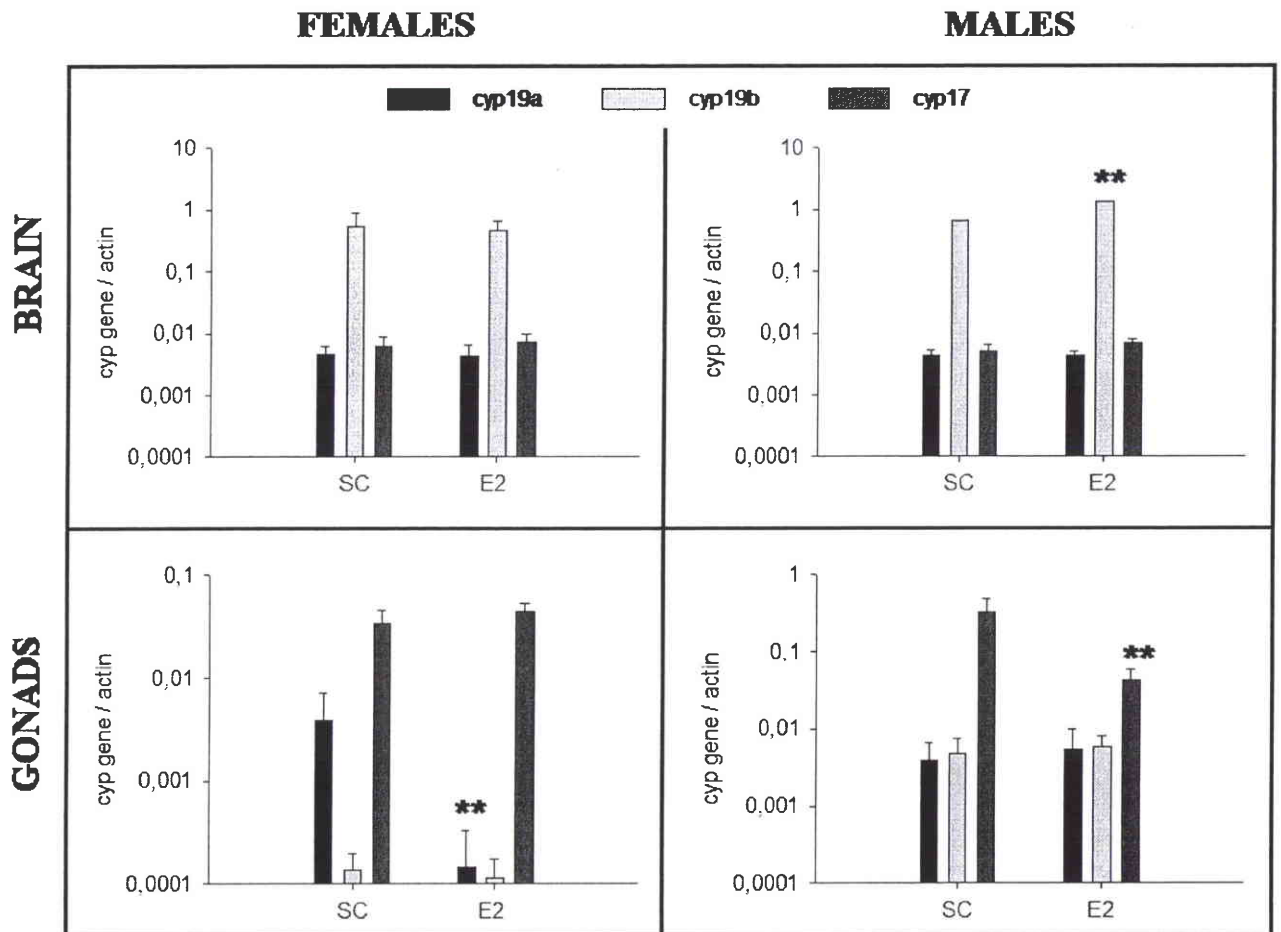


Figure 1: Effect of a 7 days exposure to 10 nM of estradiol (E2) on cyp19a, cyp19b and cyp17 genes expressions in brain and gonads of adult male and female zebrafish. Expressions of cyp genes were normalised by the expression of the beta-actin gene in the same sample. Results are express as mean  $\pm$  SD.  $n = 6$  fish analysed per treatment. SC : solvent control. \*\* indicate significant difference between treated fish and SC fish (Kruskall-Wallis test, and Mann-Whitney U test,  $p < 0.01$ ).

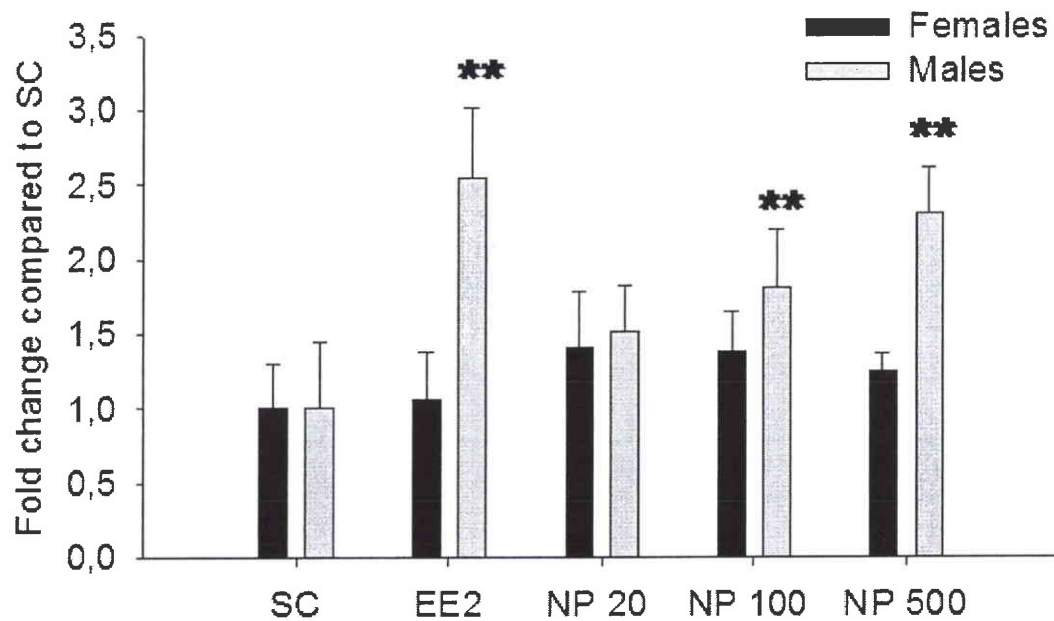


Figure 2: Effect of a 7 days exposure to ethinylestradiol or nonylphenol on *cyp19b* gene expression in the brain of adult male and female zebrafish. *Cyp19b* gene expression was normalised by the expression of the beta-actin gene in the same sample. Results are expressed as mean  $\pm$  SD and in fold induction compared to solvent control (SC). EE2 : ethinylestradiol 10 nM, NP 20 : nonylphenol 20  $\mu$ g/L, NP 100 : nonylphenol 100  $\mu$ g/L, NP 500 : nonylphenol 500  $\mu$ g/L.  $n = 6$  fish analysed per treatment. \*\* indicate significant difference between treated fish and SC fish (Kruskall-Wallis test, and Mann-Whitney U test,  $p < 0.01$ ).



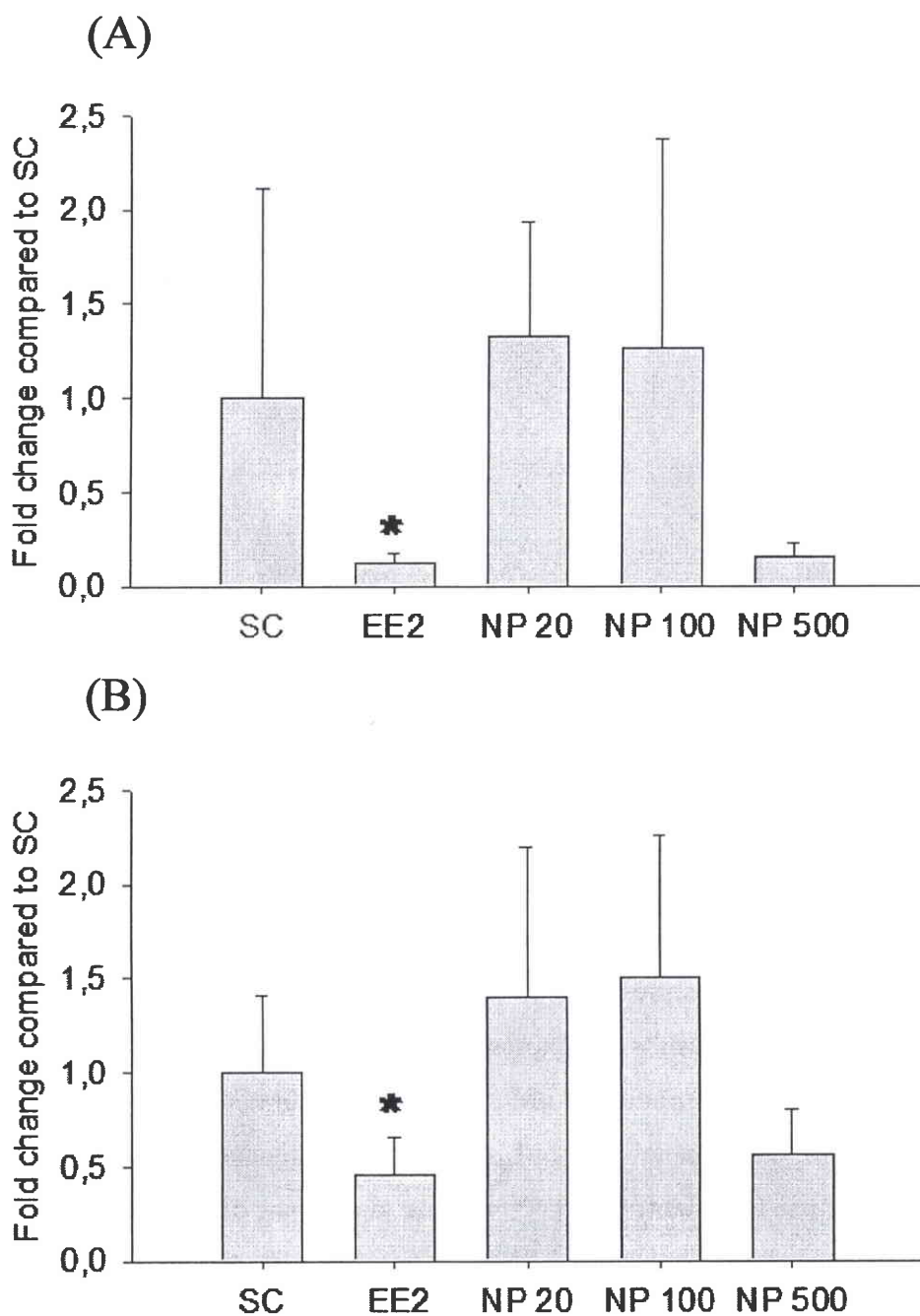


Figure 3: Effect of a 7 days exposure of adult zebrafish to ethinylestradiol or nonylphenol on cyp19a gene expression in the ovary (A), and cyp17 gene expression in the testis (B). Cyp genes expressions were normalised by the expression of the beta-actin gene in the same sample. Results are expressed as mean  $\pm$  SD and in fold induction compared to solvent control (SC). EE2 : ethinylestradiol 10 nM, NP 20 : nonylphenol 20  $\mu$ g/L, NP 100 : nonylphenol 100  $\mu$ g/L, NP 500 : nonylphenol 500  $\mu$ g/L.  $n = 6$  fish analysed per treatment. \* indicate significant difference between treated fish and SC fish (Kruskall-Wallis test, and Mann-Whitney U test,  $p < 0.05$ ).

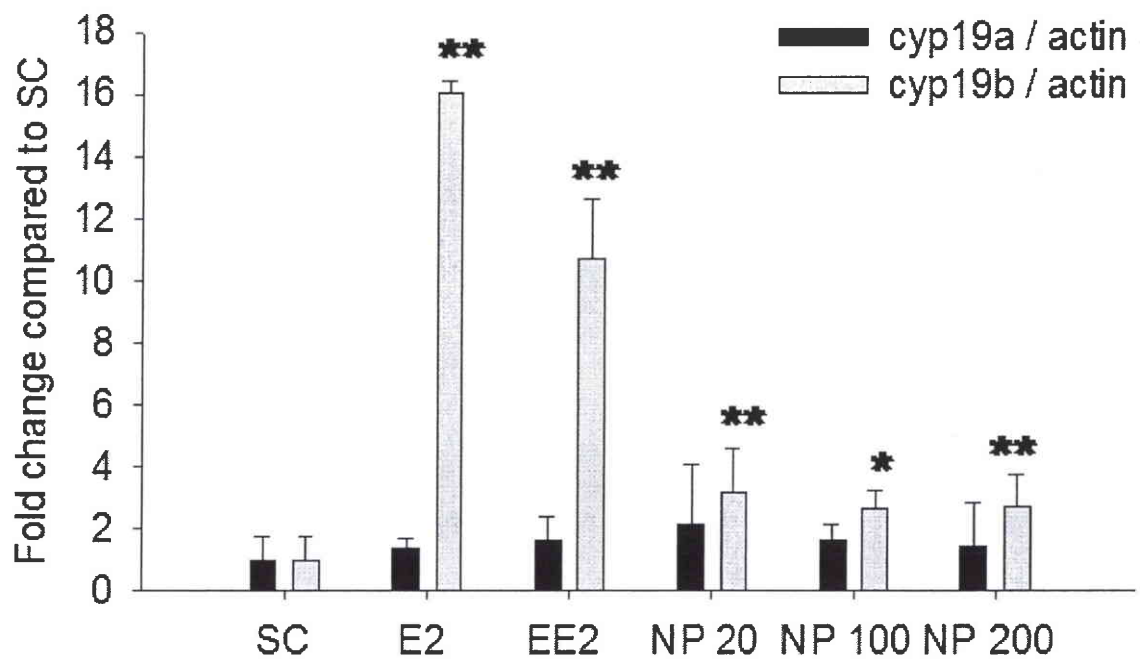


Figure 4: Effect of exposure to estradiol, ethinylestradiol or nonylphenol on cyp19a and cyp19b genes expression in zebrafish larvae. Larvae were exposed for 72 h between 17 and 20 days post fertilisation. Cyp genes expressions were normalised by the expression of the beta-actin gene in the same sample. Results are express as mean  $\pm$  SD and in fold induction compare to SC (solvent control). E2 : estradiol 10 nM ; EE2 : ethinylestradiol 10 nM, NP 20 : nonylphenol 20  $\mu$ g/L, NP 100 : nonylphenol 100  $\mu$ g/L, NP 200 : nonylphenol 200  $\mu$ g/L.  $n = 3$  pools of ten larvae analysed per treatment. \* and \*\* indicate significant difference between treated fish and SC fish (Kruskall-Wallis test, and Mann-Whitney U test, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ).

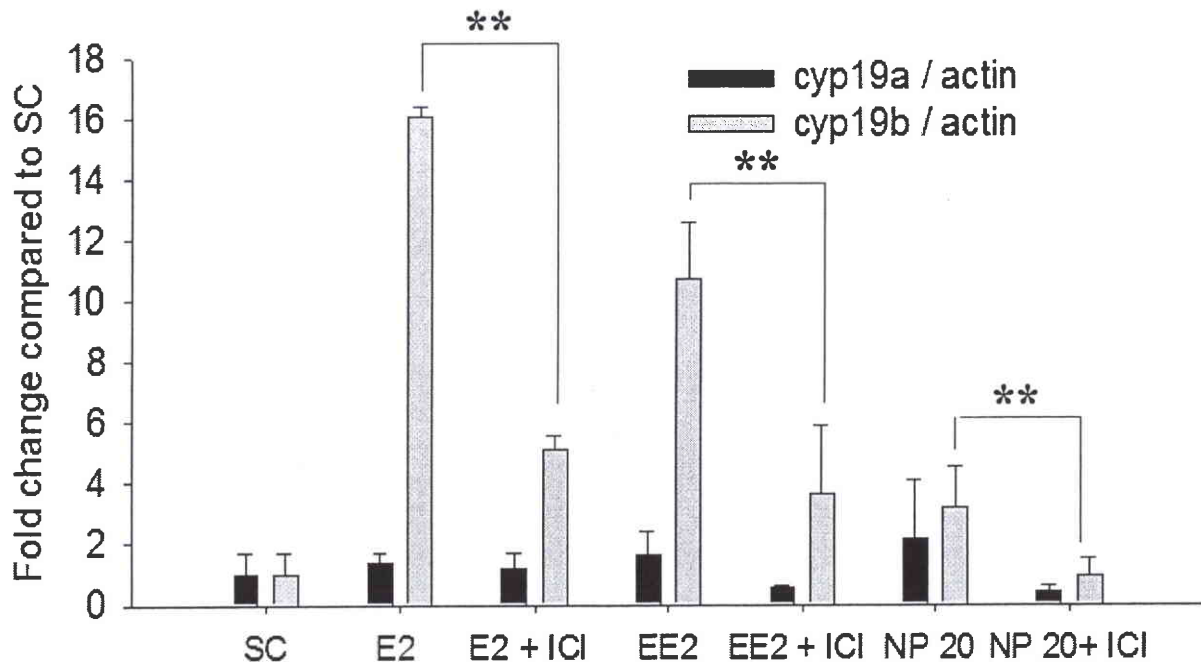


Figure 5: Effect of exposure of zebrafish larvae with estradiol, ethinylestradiol or 4-nonylphenol and ICI on cyp19a and cyp19b genes expression in zebrafish larvae. Larvae were exposed for 72 h between 17 and 20 days post fertilisation. Results are express as mean  $\pm$  SD and in fold induction compare to SC (solvent control). E2 : estradiol 10 nM, E2 + ICI : estradiol 10 nM + ICI 0.5  $\mu$ M, EE2 : ethinylestradiol 10 nM, EE2 + ICI : ethinylestradiol 10 nM + ICI 0.5  $\mu$ M, NP 20 : 4-nonylphenol 20  $\mu$ g/L, and NP 20 + ICI : 4-nonylphenol 20  $\mu$ g/L + ICI 0.5  $\mu$ M.  $n = 3$  pools of ten larvae analysed per treatment. \*\* indicate significant difference between treated fish and solvent control fish (Kruskall-Wallis test, and Mann-Whitney U test,  $p < 0.01$ ).

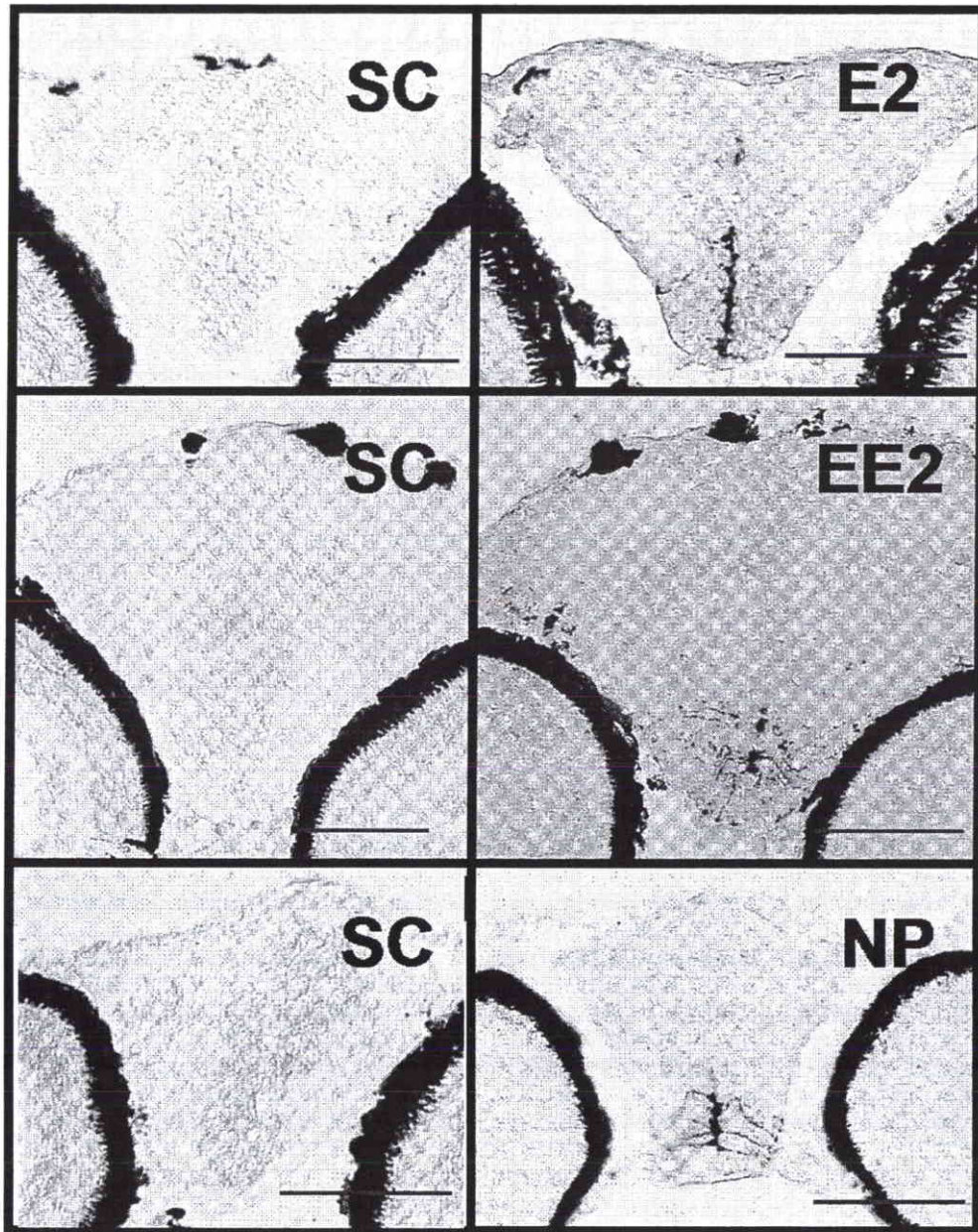
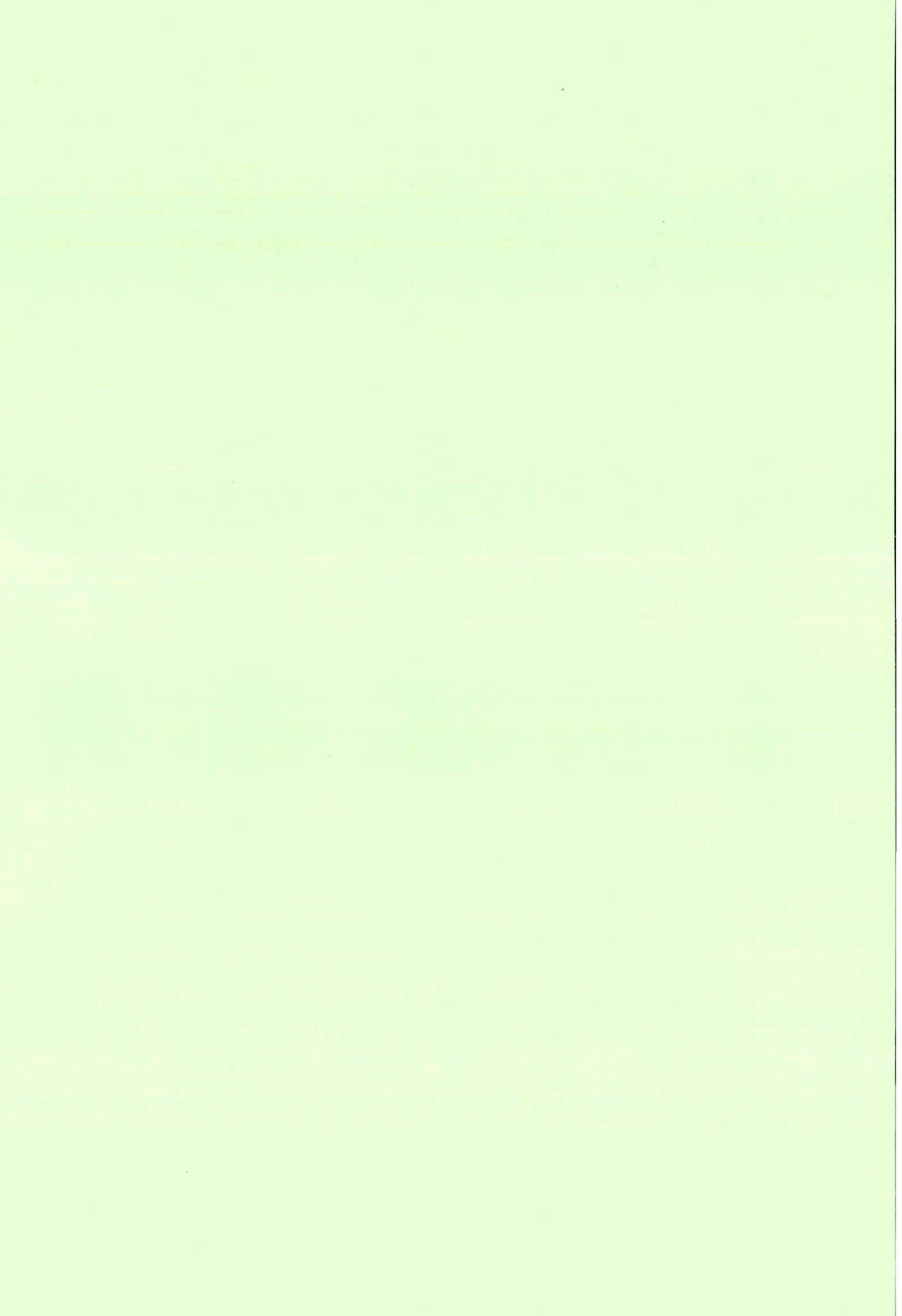


Figure 6: Effect of estradiol, ethinylestradiol and 4-nonylphenol exposure on P450aromataseB protein synthesis in zebrafish larvae brain. Zebrafish larvae were exposed for 7 days between 4 and 11 days post fertilisation. SC : brain of a solvent control larvae, E2 : brain of a zebrafish larvae exposed to 10 nM of estradiol, EE2 : brain of a zebrafish larvae exposed to 10 nM of ethinylestradiol, NP : brain of a zebrafish larvae exposed to 100 µg/L of 4-nonylphenol. Immunostaining was observed in radial glial cells in the telencephalon in E2, EE2 and NP exposed fish. No immunostaining was observed in the brain of solvent exposed fish.

## **Article 5**





## Modulation of aromatase activity and mRNA by various selected pesticides in the human choriocarcinoma JEG-3 cell line

Nathalie Laville<sup>a</sup>, Patrick Balaguer<sup>b</sup>, François Brion<sup>a</sup>, Nathalie Hinfray<sup>a</sup>,  
Claude Casellas<sup>c</sup>, Jean-Marc Porcher<sup>a</sup>, Sélim Aït-Aïssa<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> INERIS, Ecotoxicological Risk Assessment Unit, BP 2, F-60550 Verneuil-en-Halatte, France

<sup>b</sup> INSERM, U540, Molecular and Cellular Endocrinology of Cancers, F-34090 Montpellier, France

<sup>c</sup> CNRS UMR 5569, University of Montpellier 1, BP 14 491, F-34093 Montpellier Cedex 5, France

Received 26 June 2006; received in revised form 17 August 2006; accepted 18 August 2006

Available online 24 August 2006

### Abstract

Aromatase enzyme plays a central role in steroidogenesis by converting androgens to estrogens and has been proposed as an important molecular target for many environmental endocrine disrupters chemicals. In this study, we have screened 30 selected pesticides with known, unknown or supposed effects on aromatase activity, for their ability to modulate aromatase activity in the human choriocarcinoma JEG-3 cell line after both short (2 h) and long exposure (24 h). All pesticides were tested at concentrations up to 10  $\mu$ M that did not cause cytotoxicity after 24 h of exposure, as verified by the MTT viability assay. Four pesticides inhibited aromatase activity after 2 h of exposure: prochloraz ( $IC_{50} < 1 \mu$ M), fenbuconazole ( $IC_{50} = 1.1 \mu$ M), propiconazole ( $IC_{50} = 1.5 \mu$ M) and fenarimol ( $IC_{50} = 3.3 \mu$ M). Among them, prochloraz and fenbuconazole also exerted inhibitory effects after 24 h. Toxaphen (10  $\mu$ M) and heptachlor (10  $\mu$ M) inhibited aromatase activity after 24 h exposure only. Nine pesticides induced aromatase activity: aldrin, chlordane, cypermethrin, parathion-methyl, endosulfan, methoxychlor, oxadiazon, metolachlor and atrazine after 24 h of exposure, while tributyltin induced aromatase activity at 1 nM and 3 nM after both 2 h and 24 h of exposure, respectively. To further investigate the mechanisms of aromatase induction we measured CYP19 mRNA expression and showed that methoxychlor, aldrin, chlordane and tributyltin induced the transcription of the *cyp19* gene. In addition, none of the aromatase inducers transactivated the retinoic acid receptor (RAR) in JEG-3 stably transfected with a RARE-luciferase plasmid while the RAR agonist TTNPB induced both aromatase and luciferase expression in these cells. Our results, which provide new data for fenbuconazole, as an inhibitor of human aromatase, and for eight pesticides as aromatase inducers, are discussed with regards to the regulation of aromatase expression in the JEG-3 cellular context.

© 2006 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Pesticides; Aromatase activity; Aromatase mRNA; JEG-3; Retinoic acid receptor

### 1. Introduction

A number of environmental contaminants from agricultural, industrial and household origins can alter

the normal functioning, synthesis and metabolism of endogenous hormones (Sonnenschein and Soto, 1998). These substances, termed Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs), can act *via* multiple modes of action including either direct interaction with steroid hormone receptors, or by altering steroidogenesis. Cytochrome P450 aromatase (aromatase, CYP19) plays a crucial role in steroidogenesis by catalysing

\* Corresponding author. Fax: +33 3 44 55 66 05.

E-mail address: [selim.ait-aissa@ineris.fr](mailto:selim.ait-aissa@ineris.fr) (S. Aït-Aïssa).

the rate-limiting step in the conversion of androgens into estrogens (Mendelson et al., 1985; Thompson and Siiteri, 1974). In human, aromatase is expressed in several tissues, and *cyp19* gene expression is differentially regulated by tissue-specific promoters (Simpson et al., 1993).

Several *in vitro* assays, developed from different tissues and species, have been described for the assessment of the effect of chemicals on aromatase. These include microsome assays using human placental microsomes (Vinggaard et al., 2000) or trout ovarian and brain microsomes (Hinfrey et al., 2006; Monod et al., 1993), as well as cell-based assays using different cell lines such as the adrenocortical H295R (Sanderson et al., 2000), ovarian KGN (Nishi et al., 2001) or placental JEG-3 (Bahn et al., 1981) cell lines.

Placenta is the main organ responsible for estrogen synthesis in pregnant women. The JEG-3 cell line are human choriocarcinoma cells derived from malignant placental tissues. As in placenta, JEG-3 cells endogenously express aromatase activity at detectable levels (Bahn et al., 1981) and the *cyp19* gene expression is under the control of a distal promoter I.1 located adjacently upstream of exon I.1 in the gene (Means et al., 1991). Various factors are involved in the up-regulation of *cyp19* gene expression in JEG-3 cells. These include protein kinase A activator (cAMP) (Harada et al., 2003), retinoic acids (Sun et al., 1998; Zhu et al., 2002), phorbol ester protein kinase C activator 12-*O*-tetradecanoyl phorbol 13-acetate (TPA) and to a lesser extent IL-1 $\beta$  (Ritvos and Voutilainen, 1992). Since regulation of aromatase expression in these cells is the same as in placenta, JEG-3 cells have been proposed as a valuable tool for the assessment of a potential steroidogenesis disruption during embryonic and foetal development (Drenth et al., 1998).

Several classes of pesticides have been identified as capable of altering this enzyme, either directly as competitive inhibitors of the catalytic activity, or indirectly through a modulation of its expression in cell-based assays. For instance, 2-chloro-*s*-triazines herbicides like atrazine, simazine and propazine *in vitro* (Sanderson et al., 2000, 2002), and *p,p'*-dichlorodiphenyldichloroethane (*p,p'*DDE) *in vitro* and *in vivo* (You et al., 2001) have been demonstrated to induce aromatase activity. Conversely, pesticides including imidazole-like fungicides such as prochloraz, triadimenol, propiconazole, triadimefon and fenarimol have been found to inhibit aromatase activity *in vitro* (Andersen et al., 2002; Vinggaard et al., 2000). Besides, many pesticides are currently used and increasingly detected in surface waters (IFEN, 2003, 2004), and, for

a number of them, there is a lack of information on their potential to interfere with aromatase.

In the present study, 30 pesticides were screened for their ability to modulate aromatase activity in the human choriocarcinoma JEG-3 cell line. The selected pesticides (Table 1) belong to different chemical classes and are of environmental concern, i.e. they are commonly found in surface waters as contaminants, and some are currently authorised for use. While the majority of them have not been tested yet for their effects on aromatase activity in this cellular model, some have been clearly described as aromatase inhibitors (prochloraz, fenarimol, propiconazole) or inducer (atrazine) in this or other cell systems or organisms, and were therefore used as reference pesticides. To our knowledge, there is no or limited information on aromatase alteration in a cellular system by the other pesticides tested in our study. By using the tritiated water assay after both short (2 h) and long (24 h) times of exposure, we identified either inhibition or induction, respectively, of aromatase enzymatic activity by the selected pesticides. Pesticides that were newly found to induce aromatase activity were further investigated for their action at the transcriptional level and through the retinoic acid receptor (RAR) signalling pathway.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

Radiolabelled [ $1\beta$ - $^3\text{H}$ ]androst-4-ene-3,17-dione ( $1\beta$ - $^3\text{H}$ -A) was from Perkin-Elmer Life and Analytical Science (Courtaboeuf, France). The RAR pan-antagonist CD3106 was a generous gift from Serge Michel (Galderma Research, Sophia Antipolis, France) and the RAR pan-agonist P-[(E)-2-(5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthalenyl-1-propenyl)] benzoic acid (TTNPB) were provided by Tocris Cookson Ltd. (Bristol, United Kingdom). Dimethylsulfoxide (DMSO), 4-hydroxyandrostenedione (4-OHA), forskolin and D-luciferine (luc), were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). All pesticides were from Sigma-Aldrich, except azimsulfuron (DuPont de Nemours, France), tributyltin, zinc pyrrithione (Acros, Halluin, France) and sodium arsenite (Alpha Aesar, Bischheim, France). Stock solutions of chemicals were made up in DMSO and stored at  $-20^\circ\text{C}$ . For cell exposure, all pesticides were diluted to the desired concentrations in the culture medium so that the final solvent concentration did not exceed 0.1% (v/v) and would not affect cell viability.

### 2.2. Cell viability

The cellular viability was measured by using the methylthiazol-tetrazolium (MTT) assay (Mosmann, 1983). MTT was dissolved in culture medium to a concentration of 0.5 mg/ml



Table 1

Summary of the studied pesticides according to the chemical classes, their use and published data on their ability to modulate aromatase activity by using *in vitro* assays

Chemicals	Chemical class <sup>a</sup>	CAS no.	Use <sup>b</sup>	Reported effect on aromatase activity in microsome assays <sup>c</sup>	Reported effect on aromatase activity in cell based assays <sup>c</sup>	Effect on aromatase activity in our study <sup>c</sup>	Effect on aromatase mRNA in our study <sup>c</sup>
Atrazine	AZO	1912-24-9	I	n.e. <sup>d</sup>	↑ <sup>e</sup> , n.e. <sup>f</sup>	↑	n.e.
Tributyltin (TBT)	OM	1461-22-9	AF	n.e. <sup>d</sup>	n.e. <sup>f</sup> , ↑ <sup>g</sup> , ↓ <sup>h</sup>	↑	↑
Methoxychlor	OC	72-43-5	I/A	n.e. <sup>d</sup>	n.e. <sup>f</sup>	↑	↑
Endosulfan	OC	115-29-7	I/A	n.e. <sup>d</sup> , ↓ <sup>i</sup>	↓ <sup>f</sup>	↑	n.e.
Aldrin	OC	309-00-2	I	n.e. <sup>d</sup>	↓ <sup>f</sup>	↑	↑
Cypermethrine	PYRE	67375-30-8	I/A	n.e. <sup>d</sup>	↓ <sup>f</sup>	↑	n.e.
Chlordane	OC	57-74-9	I/A	n.e. <sup>d</sup>	–	↑	↑
Parathion methyl	DIC	298-00-0	I/A	n.e. <sup>d</sup>	–	↑	n.e.
Oxadiazon	OXA	19666-30-9	H	n.e. <sup>d</sup>	–	↑	n.e.
Metolachlor	OC	51218-45-2	I	n.e. <sup>d</sup>	–	↑	n.e.
Fenarimol	PYR	60168-88-9	F	↓ <sup>d,i</sup>	↓ <sup>e,f,g</sup>	↓	n.d.
Prochloraz	AZO	67747-09-5	F	↓ <sup>d,i</sup>	↓ <sup>e</sup>	↓	n.d.
Propiconazole	AZO	262-104-4	F	↓ <sup>d,i</sup>	↓ <sup>e,f</sup>	↓	n.d.
Heptachlor	OC	76-44-8	I	n.e. <sup>d,i</sup>	↑ <sup>f</sup>	↓	n.d.
Fenbuconazole	AZO	114369-43-6	F	↓ <sup>d</sup>	–	↓	n.d.
Toxaphene	OC	8001-35-2	I/A	–	–	↓	n.d.
Benomyl	CAR	17804-35-2	A/F/N	n.e. <sup>d</sup>	↑ <sup>f</sup>	n.e.	n.d.
Vinclozolin	DIC	50471-44-8	F	n.e. <sup>d,i</sup>	↑ <sup>e</sup> , n.e. <sup>f</sup>	n.e.	n.d.
<i>o,p'</i> DDT	OC	50-29-3	I/A	n.e. <sup>d</sup>	n.e. <sup>f</sup>	n.e.	n.d.
Mecoprop	OC	16484-77-8	H	n.e. <sup>d</sup>	–	n.e.	n.d.
Aminotriazole	AZO	61-82-5	H	n.e. <sup>d</sup>	–	n.e.	n.d.
Diuron	PHE	330-54	H	n.e. <sup>d,i</sup>	–	n.e.	n.d.
Isoproturon	PHE	34123-59-6	H	n.e. <sup>d</sup>	–	n.e.	n.d.
Fipronil	PRZ	120068-37-3	I	n.e. <sup>d</sup>	–	n.e.	n.d.
Bupirimate	PYR	41483-43-6	F	n.e. <sup>d</sup>	–	n.e.	n.d.
Permethrine	PYRE	52645-53-1	I/A	n.e. <sup>d</sup>	–	n.e.	n.d.
Azimsulfuron	SULF	120162-55-2	H	n.e. <sup>d</sup>	–	n.e.	n.d.
Pretilachlor	OC	51218-49-6	H	–	–	n.e.	n.d.
Zinc pyriithione	OM	1121-31-9	F/AF	–	–	n.e.	n.d.
Sodium arsenite	–	7784-46-5	F	–	–	n.e.	n.d.

<sup>a</sup> AZO: azole; CAR: carbamate; DIC: dicarboximide; OC: organochlorine; OM: organometal; OP: organophosphorus; OXA: oxadiazole; PHE: phenylurea; PRZ: pyrazole; PYR: pyrimidine; PYRE: pyrethroid; SULF: sulfonyleurea.

<sup>b</sup> A: acaricide; F: fungicide; H: herbicide; I: insecticide; AF: antifouling.

<sup>c</sup> n.e.: no effect; ↑: aromatase induction; ↓: aromatase inhibition; –: no data could be found in the literature; n.d.: not determined.

<sup>d</sup> In rainbow trout brain and ovary microsomes (Hinfray et al., 2006).

<sup>e</sup> In H295R cells (Sanderson et al., 2002).

<sup>f</sup> In KGN cells (Morinaga et al., 2004; Ohno et al., 2004).

<sup>g</sup> In JEG-3 cells (Nakanishi et al., 2002; Vinggaard et al., 2000).

<sup>h</sup> In KGN cells (Saitoh et al., 2001).

<sup>i</sup> In human placental microsomes (Andersen et al., 2002; Vinggaard et al., 2000).

and added to the cells after the culture medium had been removed. After 1 h of incubation at 37 °C, the medium was removed and the purple formazan product was dissolved in isopropanol. Plates were read at 570 nm against a 660 nm reference wavelength on a microplate reader (BioTek Instruments, France). Cell viability was expressed as a percentage of the corresponding control value.

### 2.3. JEG-3 choriocarcinoma cells cultures

JEG-3 human choriocarcinoma cells (ATCC # HTB-36) were kindly provided by Pr. Seralini (University of

Caen, France). The cells were maintained in DMEM supplemented with 10% of foetal calf serum (FCS), 5% Hepes buffer, 5% of non essential amino acids and 1% antibiotic (penicillin–streptomycin) in a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere at 37 °C. For chemical exposure, JEG-3 were seeded in 24-well culture plates (Dominique Dutscher S.A., Saint Quentin Fallavier, France) at a density of 50,000 cells/well in DMEM without phenol red, supplemented with 3% of dextran-coated charcoal treated foetal calf serum (DCC-FCS) and 1% antibiotic (penicillin–streptomycin). Cells were left to attach for 24 h before changing culture media and exposing the cells to the xenobiotics for 2 h or 24 h. Under these conditions, the cell

monolayers were 80% confluent at the time of running the aromatase assay and *cyp19* mRNA measurement.

#### 2.4. Aromatase assay

The catalytic aromatase activity was determined by using the tritium release assay as described previously (Drenth et al., 1998; Lephart and Simpson, 1991) with minor modifications. Briefly, 0.4 ml of DMEM–3% DCC–FCS, containing 80 nM of [ $^3\text{H}$ ] androst-4-ene-3,17-dione (25.3 Ci/mmol) was added to the wells following pesticides treatment. After incubation for 2 h at 37 °C, plates were placed on ice and 400  $\mu\text{l}$  of medium was transferred to a borex-tube (VWR, Fontenay-sous-Bois, France). The medium was extracted with 2 ml of diethyl ether, vortexed for 30 s and centrifuged for 10 min at 3000  $\times g$ . This step was repeated once. Two hundred microliters of the aqueous phase obtained were then mixed with 200  $\mu\text{l}$  of a 5% (w/v) charcoal suspension, vortexed for 30 s and centrifuged at 3000  $\times g$  for 20 min. A 150  $\mu\text{l}$  aliquot was removed and mixed with 750  $\mu\text{l}$  of scintillation liquid OptiPhase 'Hi safe' 3 in 24-well flexiplates (Perkin-Elmer Life and Analytical Science, Courtaboeuf, France) and counted for 2 min in a Liquid Scintillation Counter (Wallac Microbeta, Perkin-Elmer, France). Under our experimental conditions, the apparent  $K_m$  and  $V_{max}$  in JEG-3 cells were found to be 82.6 nM and 66.04 nmol/(min mg), respectively. The specificity of the aromatase assay was verified by using 4-OHA, an irreversible inhibitor of the catalytic activity of aromatase that blocks the formation of estrone (Brodie et al., 1981). Results were expressed in % of basal aromatase activity in solvent treated cells (control).

Two times of exposure were used: firstly, a 2 h short time exposure to the test chemical concomitantly with  $\beta\text{-}^3\text{H}\text{-A}$  was used in order to assess direct competitive effects on the aromatase enzymatic complex (e.g. allosteric factors or post-translational events like phosphorylation) (Balthazart et al., 2001; Heneweer et al., 2004); secondly a 24 h exposure to the test chemical prior to changing the media and starting the aromatase assay for 2 h, to take into account the possible effects of chemicals on aromatase gene expression through interference at the transcription or (post)translation levels.

#### 2.5. *Cyp19* mRNA measurement

*Cyp19* and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNAs were quantified directly from crude JEG-3 cell lysates exposed 24 h to inducers of aromatase activity with the QuantiGene Reagent system (Genospectra, Fremont, USA), according to the manufacturer's instructions. This assay is based upon the branched DNA technology, which relies on cooperative hybridisation between the target mRNA and a specific probe set. The probe set consists of three types of oligonucleotides: capture extenders (CEs), label extenders (LEs), and blocking probes (BLs), whose sequences were selected based on the sequences of the target and house keeping genes: human aromatase (Accession Number X13589) and human GAPDH (Accession Number AF261085). The

cells were lysed in QuantiGene Lysis Working Reagent at 50 °C for 30 min. Eighty microliters of lysate containing either 60,000 cells for *cyp19* mRNA quantification or 1000 cells for the house keeping gene quantification GAPDH, were transferred to a separate 96-wells capture plate. The appropriate probe set and the lysis reagent (LWR) were then added to the lysates. The capture plates were sealed and incubated at 53 °C for 18 h. After addition of amplifier, label probe and substrate reagents, the plates were transferred to the luminometer (Victor<sup>2</sup>, Perkin-Elmer, France), and the luminescence intensity was read. *Cyp19* mRNA expression was normalised by the GAPDH mRNA expression for which no variation was observed under pesticides treatment. Results were expressed as fold induction  $\pm$  standard deviation of the solvent treated cell control.

#### 2.6. Stable transfection

The stably transfected cell line JEG-3-RLN was obtained as already described (Balaguer et al., 2001). Briefly, we transfected JEG-3 cells with the retinoid responsive gene RARE3-tk-LUC<sup>+</sup>-SVNeo plasmid (Balaguer et al., 2001). Selection of resistant clones by G418 was performed at 1 mg/ml. JEG-3 clones that expressed retinoic acid (RA)-inducible luciferase were identified using photon-counting cameras (Argus 100 from Hamamatsu and Night Owl from Berthold). The most responsive clone was isolated and called JEG-3-RLN.

#### 2.7. Luciferase assay

For transactivation assays, the stably transfected JEG-3-RLN cells were seeded in DCC-FCS medium at a density of  $5 \times 10^4$  cells per well of 96-well white opaque tissue culture plates, and left to incubate for 24 h. After cell exposure, the medium was replaced by 50  $\mu\text{l}$  of medium containing  $3 \times 10^4$  M D-luciferin and the luminescence was read after 5 min in a MicroBeta Wallac microtiter plate luminometer. Results are expressed as percent of maximal luciferase induction by the RAR pan-agonist TTNPB (Loeliger et al., 1980).

#### 2.8. Data analysis

In all assays, each compound was tested at various concentrations in at least three independent experiments, which always included positive (TTNPB or forskolin) or negative (solvent) controls. All experimental data were expressed as means  $\pm$  standard deviation (S.D.) of triplicates of exposure. Data were subjected to statistical analysis by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's bilateral post hoc test. A value of  $p < 0.05$  was considered significant. The SPSS<sup>TM</sup> software version 10.1 was used for the statistical analysis. For the aromatase assay, non-linear regression analysis of enzyme kinetic data was performed with Sigma Plot<sup>TM</sup> 8.0 in order to calculate apparent  $K_m$  and  $V_{max}$  values.  $EC_{50}$  and  $IC_{50}$  of RARtransactivation and aromatase inhibition were calculated with the Regtox 6.3 Microsoft Excel macro (Vindimian, 2006).

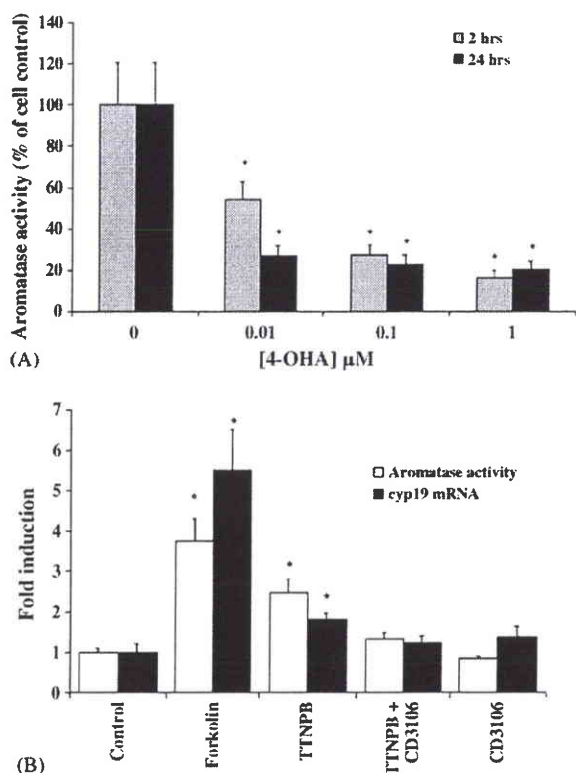


Fig. 1. Effects of model compounds on aromatase expression in JEG-3 cells. (A) Time- and concentration-dependent inhibition of aromatase activity by 4-OHA. (B) Induction of enzymatic activity and mRNA expression by forskolin, TTNPB, and CD3106 after a 24-h exposure. Values are means of triplicates  $\pm$  S.D. \*Statistically different values from solvent control ( $p < 0.05$ ).

### 3. Results

#### 3.1. Effects of model compounds on aromatase activity in JEG-3 cells

We first used model aromatase inhibitors and inducing compounds to check the validity of the aromatase response in JEG-3 cells in our assay conditions. The competitive inhibitor 4-OHA caused inhibition of aromatase activity in JEG-3 cells after both 2 h and 24 h of exposure (Fig. 1a). The strong inhibition observed after 2 h at 10 nM suggested that short-term exposure is suitable to detect competitive inhibition at the active site of the enzyme. The up-regulation of aromatase expression in this cellular assay was verified by using TTNPB, the RAR pan-agonist, and forskolin, the adenylate cyclase stimulator, as model activators of aromatase gene expression through RAR (Sun et al., 1998) or cAMP pathways (Harada et al., 2003), respectively. After a 24 h exposure, TTNPB and forskolin (Fig. 1b) caused a significant induction of both aromatase enzymatic activity (3.5-fold

by forskolin and 2.5-fold by TTNPB) and *cyp19* mRNA (5-fold by forskolin and 2-fold by TTNPB). No effect of these two compounds on aromatase expression could be detected after 2 h of exposure (data not shown). In addition, induction of aromatase by TTNPB was clearly mediated by the RAR since it was blocked by CD3106, the RAR pan-antagonist (Fig. 1b).

#### 3.2. Effects of pesticides on aromatase activity in JEG-3 cells

Preliminary MTT tests showed that, at 10  $\mu$ M, none of the pesticides altered significantly the cellular viability after 24 h of exposure, excepted TBT, which was cytotoxic right from 0.1  $\mu$ M (data not shown). Pesticides were then firstly tested in single dose (10  $\mu$ M) for their effect on aromatase activity after 2 h and 24 h. Thereafter, when significant effects were observed, several concentrations were assayed so that dose–response curves could be established. The results obtained for aromatase inhibition (Fig. 2) and induction (Fig. 3) are detailed below.

Among the 30 pesticides tested, six inhibited aromatase activity in the JEG-3 cell line (Fig. 2). After 2 h of exposure, prochloraz, fenbuconazole, propiconazole

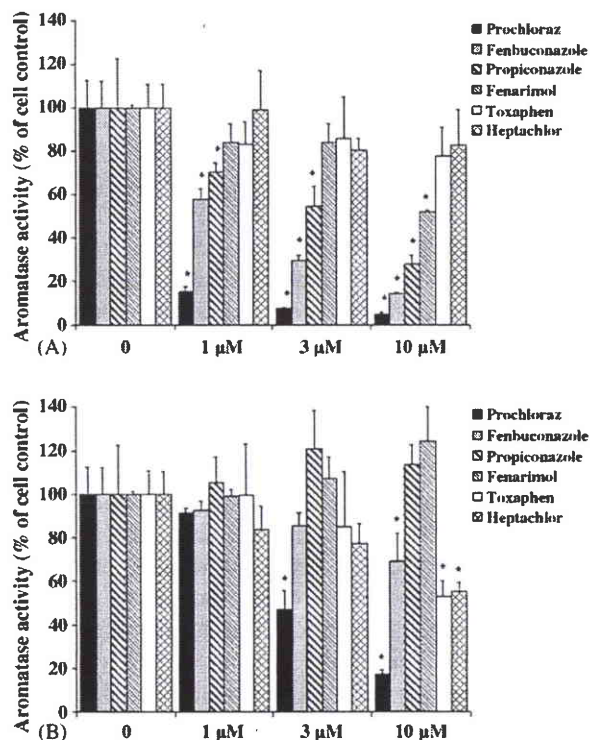


Fig. 2. Pesticides as inhibitors of aromatase activity in JEG-3 cells: (A) after 2 h of exposure with radiolabelled androstenedione, and (B) after 24 h of exposure prior to the aromatase assay. Values are means of triplicates  $\pm$  S.D. \*Statistically different values from solvent control ( $p < 0.05$ ).

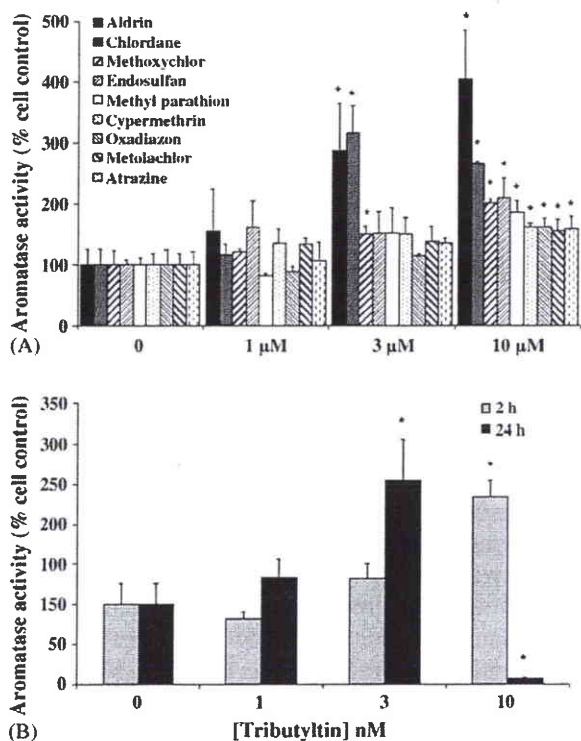


Fig. 3. Pesticides as inducing agents of aromatase activity: (A) after 24 h of exposure or (B) after both 2 h and 24 h of exposure to TBT. Values are means of triplicates  $\pm$  S.D. \*Statistically different values from solvent control ( $p < 0.05$ ).

and fenarimol at 10  $\mu$ M inhibited 95%, 86%, 72% and 48% of basal aromatase activity, respectively (Fig. 2a). Their respective  $IC_{50}$  were  $<1$   $\mu$ M, 1.1  $\mu$ M, 3.3  $\mu$ M and 10  $\mu$ M. After 24 h of exposure, prochloraz and fenbucnazole inhibited 83% and 28% of basal aromatase activity, with  $IC_{50}$  of 2.4  $\mu$ M and 15.8  $\mu$ M, respectively (Fig. 2b). Fenarimol and propiconazole, which were inhibitors after 2 h, showed no effect after long time exposure (Fig. 2b). Conversely, toxaphen and heptachlor that did not modulated aromatase activity after 2 h, significantly reduced this enzyme activity by a factor two after 24 h of exposure (Fig. 2a and b). Their respective  $IC_{50}$  were 11  $\mu$ M and 16  $\mu$ M. These differences in the ability of pesticides to inhibit aromatase may reveal divergent modes of action of the pesticides to alter aromatase expression, i.e. either by direct competitive action with [ $1\beta$ - $^3$ H] androst-4-ene-3,17-dione at the active site of the enzyme or by inhibiting gene transcription.

After 24 h of exposure, 10 pesticides significantly induced aromatase activity right from 3 nM (TBT), 3  $\mu$ M (aldin, chlordane, cypermethrine, methoxychlor) or 10  $\mu$ M (endosulfan, parathion-methyl, oxadiazon, metolachlor, atrazine) (Fig. 3a). The maximal aromatase induction ranged between  $154 \pm 19\%$  for metolachlor

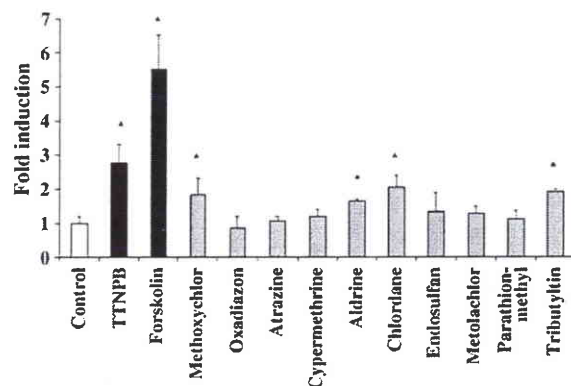


Fig. 4. Effects of pesticides found to induce aromatase activity on the expression of the *cyp19* mRNA in JEG-3 cells after 24 h of exposure. All chemicals were tested at 10  $\mu$ M except TTNPB (1  $\mu$ M) and tributyltin (3 nM). Values are means of triplicates  $\pm$  S.D. and are representative of three independent experiments. \*Statistically significant induction as compared to control cells ( $p < 0.05$ ).

and  $405 \pm 81\%$  for aldrin. Among the pesticides tested, TBT was the only one found to induce this enzyme at both times of exposure. It significantly induced aromatase activity by a factor 2.5 at 10 nM and 3 nM after 2 h and 24 h of exposure, respectively (Fig. 3b). The enzyme inhibition observed at 24 h at the highest concentration can be explained by strong cytotoxicity of this compound at 10 nM, as verified by the MTT assay.

### 3.3. Effects of aromatase inducers on *cyp19* mRNA expression

To assess whether aromatase induction by pesticides could be linked to activation of *cyp19* gene transcription, we measured CYP19 mRNA expression after exposure of JEG-3 cells for 24 h to the active pesticides. GAPDH mRNA expression was used as a reference and was not affected by the treatments in these experiments (results not shown). Among the 10 pesticides that induced aromatase activity in our experiments, only 4 were found to induce significantly *cyp19* mRNA expression (Fig. 4): methoxychlor (10  $\mu$ M), aldrin (10  $\mu$ M), chlordane (10  $\mu$ M) and tributyltin (1 nM) with fold induction values over control ranging from  $1.7 \pm 0.1$  to  $2.2 \pm 0.5$ . The effects of oxadiazon (1.1-fold), atrazine (1.2-fold), cypermethrine (1.4-fold), endosulfan (1.5-fold), metolachlor (1.4-fold) and parathion (1.3-fold) were found not statistically significant as compared to the solvent control.

### 3.4. RAR-mediated aromatase activity induction

In the JEG-3 choriocarcinoma cells, retinoids are some of the factors involved in the up-regulation of

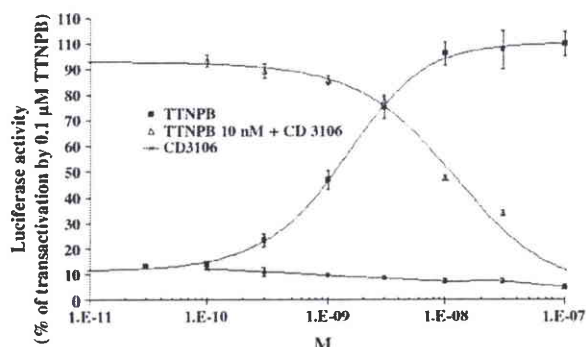


Fig. 5. Concentration–response curve of RAR-dependant luciferase activity in JEG-3 cells stably transfected with the RAREx3-TK-Luciferase gene (JEG-3-RLN). JEG-3-RLN were exposed for 16 h to several concentrations of the RAR agonist TTNPB or of the RAR antagonist CD3106 either alone or in combination with TTNPB 10 nM. Each value represents the mean of triplicate of exposure  $\pm$  S.D.

the *cyp19* gene expression (Sun et al., 1998; Zhu et al., 2002). Because pesticides have been recently described to act as agonists of RARs (Lemaire et al., 2005), we tested the hypothesis that this signalling pathway could be involved in aromatase induction in JEG-3 cells. For this purpose, JEG-3 cells stably transfected with the luciferase gene under the control of retinoic acid receptor response element (RARE) were established and used to assess luciferase induction by the selected pesticides. In these cells (JEG-3-RLN), TTNPB induced RARE-luciferase with an  $EC_{50}$  of 1.4 nM and reached maximal transactivation at 10 nM (Fig. 5). This induction was specifically RAR dependent since it was completely inhibited by the RAR antagonist CD3106 at 0.1  $\mu$ M. The CD3106 alone had no significant inhibitory effect on the basal luciferase activity.

Among the 10 pesticides that induced aromatase activity in this study, none induced luciferase activity in the JEG-3-RLN cells (results not shown). Only TBT at 1 nM slightly increased luciferase (by a factor 2) in a reproducible manner, however this effect was considered as non-specific of the RAR since it was not reversed by CD3106. Overall, these results show that pesticides have no agonistic effect on RAR mediated transcription in JEG-3-RLN cells, and, as a consequence, suggest that induction of aromatase activity by pesticides is not mediated by RARs in JEG-3 cells.

#### 4. Discussion

A number of xenobiotics including several pesticides can modulate, either positively or negatively, the catalytic activity or mRNA expression of human aromatase

*in vitro* in cellular models (Sanderson et al., 2001, 2002; Nativelle-Serpentini et al., 2003). In the present study, we newly identified several pesticides of environmental concern that belong to various chemical classes, for their ability to alter the catalytic activity and the gene expression of aromatase in the human choriocarcinoma JEG-3 cells. Moreover, first attempt to explore possible mechanisms responsible for aromatase induction by pesticides showed that RARs are not involved in this response.

In JEG-3 cells, previous studies have reported that aromatase is expressed at relatively high basal levels as compared to other cellular models like the human adrenocortical cell line (H295R) or the human breast cancer cell line MCF-7 (Sanderson et al., 2001), and is also inducible by several exogenous factors like cAMP analogues (Sanderson et al., 2001) and retinoids (Zhu et al., 2002), thus making them as a suitable model for both inhibition and induction aromatase studies. In our assay condition, aromatase expression was up-regulated by forskolin, an adenylate cyclase activator, and by TTNPB, a full agonist of RARs after overnight exposure, and was rapidly inhibited (after 2 h) by the competitive inhibitor 4OHA (Fig. 1). These results led us to further use both times of exposure in the screening of pesticides in order to consider both direct inhibition through chemical interaction with the active site of the aromatase enzyme and an effect resulting from an alteration of regulation of the aromatase gene expression. The 30 pesticides tested exerted differential effects with either inhibition, induction, or lack of response of aromatase activity in JEG-3 cells.

Prochloraz, propiconazole, and fenarimol have been described as aromatase inhibitors in various *in vitro* assays using cell-free or cellular systems derived from different tissues (see Table 1 for references). Accordingly, these pesticides were also potent aromatase inhibitors in our study, prochloraz being the most active one (Fig. 2). In addition, fenbuconazole, another imidazole fungicide, was newly identified as a potent inhibitor of aromatase activity with an  $IC_{50}$  of 1.1  $\mu$ M. This study represents, to our knowledge, the first report on its effect on human aromatase. Its inhibitory action on fish aromatase *in vitro* was also observed in our laboratory using both brain and ovary microsomes from rainbow trout (Hinfray et al., 2006). Imidazole chemicals have been described as reversible inhibitors of the human aromatase activity (Ayub and Levell, 1988). The same mechanism of action has also been suggested for fenarimol, a chlorinated fungicide and well-described aromatase inhibitor in different biological systems (Hinfray et al., 2006; Hirsch et al., 1987; Sanderson et al., 2002; Vinggaard et al., 2000). This correlates

well with the stronger inhibitions observed after 2 h co-exposure with the radioactive substrate in comparison to the longer exposure protocol. The latter did not include co-incubation of the test chemical with the radiolabeled substrate during the aromatase assay, which explained that inhibitory effects were partly reversed for prochloraz and fenbuconazole, the most potent inhibitors in JEG-3, and completely reversed for fenarimol and propiconazole. Such result also illustrates that, in a chemical screening purpose using cellular assays, short-term incubation is adapted to highlight competitive inhibition by chemicals at the active site of the enzyme.

The patterns of aromatase inhibition by toxaphen and heptachlor were quite different since their effect was only observed after 24 h exposure. This suggested involvement of down-regulation of aromatase expression by these compounds rather than an inhibition at the active site. Different effects of toxaphen on aromatase have been reported depending on the cellular model used. In JEG-3 cells, toxaphene was previously described without any effect on aromatase activity in JEG-3 at concentrations up to 3  $\mu\text{M}$  after 18 h of exposure (Drenth et al., 1998). Since we observed an inhibitory effect only at 10  $\mu\text{M}$ , it is likely that the discrepancy with the previous cited study is due to different exposure conditions. This pesticide is an antagonist of the Estrogen-related receptor alpha-1 (ERR $\alpha$ -1), an orphan nuclear receptor (Yang and Chen, 1999). In breast (SK-BR-3) and liver (HepG2) cells, its binding to the ERR $\alpha$ -1 led to an inhibition of aromatase expression, which is regulated in part by an ERR $\alpha$ -1-modulating promoter in these cells (Yang and Chen, 1999). Although ERR $\alpha$ -1 is strongly expressed in JEG-3 cells (Mehta et al., 2002), it is not known whether the promoter I.1 that regulates aromatase expression in these cells is modulated by this receptor, which could explain the down-regulation observed in our study. Heptachlor was previously shown without effect on aromatase activity neither in human placental (Vinggaard et al., 2000) nor in rainbow trout (Hinfray et al., 2006) microsomal assays. In our study, it inhibited aromatase activity in JEG-3 cells only after 24 h of exposure at 10  $\mu\text{M}$ , which corroborates the view that this pesticide does not act as a competitive inhibitor of the enzyme but rather potentially regulates aromatase expression. Conversely to our finding, heptachlor was reported to slightly increase aromatase activity in KGN cells (Morinaga et al., 2004). Although the mechanism responsible for its action is not known, these differences may be due to the tissue-specific regulation of aromatase activity (Simpson et al., 1993).

Some differential effects on aromatase induction were observed. Ten pesticides induced the enzymatic activ-

ity (Fig. 3) while induction of aromatase mRNA was observed only after exposure to metolachlor, aldrine, chlordane and TBT (Fig. 4).

Aromatase gene expression is regulated in a tissue-specific fashion by different promoters that are differently regulated by cellular transcription factors. As a consequence, depending on the studied tissue and/or the mechanism of action of a given chemical, different results can be found when comparing the effect of a same chemical in several cell lines or microsomal assays. For instance, TBT demonstrated different effects *in vitro* depending on the cellular model used (see Table 1). In both H295R (Sanderson et al., 2002) and KGN cells (Ohno et al., 2004), TBT caused a concentration-dependent decrease of aromatase activity which was correlated with cytotoxicity at concentrations above 30 nM. Conversely, it caused a dose-dependent increase of both aromatase activity and mRNA in human choriocarcinoma cell lines (JAR, JEG-3 and BeWo cell lines) at concentrations ranging from 10 nM to 100 nM after 48 h of exposure (Nakanishi et al., 2002), as we report in our study although at lower concentrations and after shorter time of exposure (Figs. 3b and 4). The mechanism responsible for this induction was not mediated by cAMP (Nakanishi et al., 2002), but it was recently shown to involve the binding of TBT to the retinoid X receptor (RXR) and the further activation of the RXR homodimer but not the RXR-RAR heterodimer (Nakanishi et al., 2005). This supports our data that TBT has low influence on retinoic acid receptor (RAR)-mediated gene transcription in JEG-3 cells.

The triazine-containing herbicides like atrazine and vinclozolin induced aromatase activity in the adrenocortical H295R cells by increasing intracellular cAMP levels, possibly through inhibition of phosphodiesterase activity (Sanderson et al., 2002) at 1  $\mu\text{M}$  for atrazine and 30  $\mu\text{M}$  for vinclozolin, but had no effect in the ovarian KGN cells (Morinaga et al., 2004; Ohno et al., 2004). In our assay conditions, atrazine, induced aromatase activity only at the highest tested concentration (10  $\mu\text{M}$ ), whereas vinclozolin (10  $\mu\text{M}$ ) had no effect on this enzyme. In H295R cells, steroidogenic CYPs are induced by synthetic cAMP analogues or through stimulation of adenylate cyclase by forskolin, which results in increased cAMP-mediated protein kinase A pathway leading to increased aromatase gene transcription. Besides, aromatase transcription is regulated by other specific factors in JEG-3 cells such as retinoic acid receptor, TPA and II- $\beta$  which might modulate the sensitivity of these cells to xenobiotics that are able to increase intracellular cAMP.

Methoxychlor, cypermethrine, aldrin, endosulfan and chlordane have been rarely studied regarding their *in vitro* effects on aromatase activity. Cypermethrin and chlordane were described to cause a slight inhibition of aromatase activity in KGN cells (Morinaga et al., 2004) and in ERR $\alpha$ -1 transfected HepG2 cells (Yang and Chen, 1999), respectively. Methoxychlor, aldrin and endosulfan were unable to modulate this enzyme in KGN cells (Morinaga et al., 2004). In JEG-3 cells, these five compounds significantly induced aromatase activity after a 24 h exposure. Again, the discrepancy between our results and those found in literature could be due to the different regulation of aromatase expression in JEG-3 cells in comparison with *in vitro* models derived from ovarian or hepatic carcinomas (Simpson et al., 1993). Finally, methyl-parathion, oxadiazon and metolachlor were here newly identified as inducers of aromatase activity in JEG-3 cells. Their mechanisms of intracellular action in human cells as EDCs are unknown although a very recent study has described oxadiazon and metolachlor as potent agonists of the PXR (Lemaire et al., 2006a). Whether this receptor is present and can regulate aromatase expression in JEG-3 cells remains to be evaluated.

A fairly unexpected result was the finding that some of the pesticides that induced aromatase activity had no effect on mRNA production, but could suggest that regulation events occurred at the post-translational level. Such hypothesis is based on similar observation that have been previously described in JEG-3 cells pre-exposed to steroidal (4OHA, atamestane) and non steroidal (fadrozole, vorozole, aminoglutethimide) aromatase inhibitors (Harada et al., 1999; Yue and Brodie, 1997). These compounds increased intracellular immunoreactive aromatase protein, but not aromatase mRNA, through inhibition of aromatase protein degradation provided by a stabilisation of the enzyme–substrate complex (Harada et al., 1999; Yue and Brodie, 1997). Further studies using inhibitor of protein synthesis, such as cycloheximide, or immunoreactive detection of aromatase protein in JEG-3 cells will be necessary to assess whether inhibition of aromatase protein turnover may explain aromatase induction by these pesticides.

Finally, we further investigated the mechanisms of aromatase induction by pesticides by evaluating their ability to elicit a RAR-mediated transcriptional activation. Indeed, the CYP19 promoter in JEG-3 cells contains RARE and aromatase activity is regulated by RARs, the main isoform present in these cells being the RAR $\alpha$  (Sun et al., 1998). The finding that none of the pesticides that induced aromatase activity transacti-

vated the RAR $\alpha$  in JEG-3 might be related to the recent finding that five organo-chlorinated pesticides, including aldrin, chlordane, and endosulfan, could transactivate the RAR $\beta$  and the RAR $\gamma$  but not the RAR $\alpha$  in HeLa cells stably transfected with specific RAR-responsive reporter gene (Lemaire et al., 2005). Taken together, our results demonstrate that some pesticides may induce aromatase activity through transcriptional activation of the CYP19 gene, but this transactivation is unlikely to be mediated by RAR $\alpha$  in JEG-3 cells. As discussed above, other signalling pathways, such as RXR or cAMP/protein kinase A, could be involved in the transcriptional activation of aromatase gene by these pesticides.

When considering the physiologic consequences of the modulating effects on aromatase by pesticides, it is important to relate the present findings to the levels of human exposure. We have shown that several pesticides were able to modulate human aromatase activity, the most potent ones being prochloraz, fenbuconazole and propiconazole as aromatase inhibitors and TBT, aldrin and chlordane as aromatase inducers. Except for TBT that was active at nM concentrations, most compounds were active in the 1–10  $\mu$ M range (corresponding to 0.1 ppm to 4 ppm). For pesticides, reported internal doses in human fluids are usually in the low to middle ppb range (CDC, 2005), which are lower than the active concentrations that we found in this study. Thus, it would appear that normal human exposure to the chemicals investigated in this study would be unlikely to cause reproductive dysfunction through aromatase disruption. However, regarding the potential risk following exposure to such compounds, no definite conclusion can be drawn from a single *in vitro* assay. First, because some pesticides have been shown to be active on different mechanisms involved endocrine disruption such as interaction with androgen or estrogen receptors, as well as with hormone metabolism. For instance, chlordane, an inducer of aromatase in this study, is also an agonist of the estrogen receptor and an antagonist of the androgen receptor (Lemaire et al., 2006a,b; Kojima et al., 2004). Thus, the same chemical may be able to interact *in vivo* with different endocrine targets and generate alteration in regulatory pathways with associated physiological consequences. Second, because humans are continuously exposed to multiple chemical agents that can potentially act as endocrine disrupters and that are capable of accumulating in the organism. Hence, because of possible interactive action between different chemicals and on different endocrine targets, assessment of *in vivo* endocrine disrupting effects of the pesticides is needed in order to conclude on their potential risk for human health.

## 5. Conclusion

In this study fenbuconazole was identified as a new inhibitor of human aromatase activity. In addition, we found out new inducers of aromatase activity, namely aldrin, chlordane, cypermethrine, methylparathion, endosulfan, methoxychlor, oxadiazon and metolachlor. The observed induction was linked to a transcriptional activation by 4 out of 10 pesticides, while for the six others, post-transcriptional regulation might be involved. However, due to the complexity of the aromatase regulation at different levels of gene expression, the diversity of the chemicals tested and the specificity of the cellular model, further work is still to be done in order to elucidate the mechanisms of aromatase activation by toxicants in these cells. Nonetheless, this study provides support for the use of JEG-3 cells for the assessment of both inhibition and induction of aromatase by pesticides. Moreover, when compared with the different data reported in literature, our results emphasise the view that tissue-specific up-regulation of aromatase activity must be taken into account for the choice of the cell-based model to be used in the *in vitro* assessment of potential aromatase disruption in human. Finally, because several of these pesticides are currently used in many agricultural applications and are increasingly found in surface waters, the present study, together with other recent publications on the endocrine effects of pesticides (Andersen et al., 2002; Kojima et al., 2004; Lemaire et al., 2005, 2006a,b), strengthens the view that these chemicals may contribute, at least in part, to the occurrence of reproductive adverse effects in both human and aquatic organisms.

## Acknowledgements

This work was supported by the Budget Civil de Recherche et de Développement (BCRD AP04), the AFSSET (RD-2004-01), and a doctoral fellowship from the Ministère de la Recherche to NL. The authors wish to thank Catherine Dziukala for her technical support during her training period.

## References

- Andersen, H.R., Vinggaard, A.M., Rasmussen, T.H., Gjermansen, I.M., Bonefeld-Jorgensen, E.C., 2002. Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity, and aromatase activity *in vitro*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 179, 1–12.
- Ayub, M., Levell, M.J., 1988. Structure-activity relationships of the inhibition of human placental aromatase by imidazole drugs including ketoconazole. *J. Steroid Biochem.* 31, 65–72.
- Bahn, R.S., Worsham, A., Speeg Jr., K.V., Ascoli, M., Rabin, D., 1981. Characterization of steroid production in cultured human choriocarcinoma cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 52, 447–450.
- Balaguer, P., Boussioux, A.M., Demirpence, E., Nicolas, J.C., 2001. Reporter cell lines are useful tools for monitoring biological activity of nuclear receptor ligands. *Luminescence* 16, 153–158.
- Balthazart, J., Baillien, M., Ball, G., 2001. Phosphorylation processes mediate rapid changes of brain aromatase activity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 79, 261–277.
- Brodie, A.M., Garrett, W.M., Hendrickson, J.R., Tsai-Morris, C.H., Marcotte, P.A., Robinson, C.H., 1981. Inactivation of aromatase *in vitro* by 4-hydroxy-4-androstene-3,17-dione and 4-acetoxy-4-androstene-3,17-dione and sustained effects *in vivo*. *Steroids* 38, 693–702.
- CDC, 2005. Third National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, pp. 1–467.
- Drenth, H., Bouwman, C., Seinen, W., Van den Berg, M., 1998. Effects of some persistent halogenated environmental contaminants on aromatase (CYP19) activity in the human choriocarcinoma cell line JEG-3. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 148, 50–55.
- Harada, N., Honda, S.I., Hatano, O., 1999. Aromatase inhibitors and enzyme stability. *Endocrine-Related Cancer* 6, 211–218.
- Harada, N., Yoshimura, N., Honda, S., 2003. Unique regulation of expression of human aromatase in the placenta. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 86, 327–334.
- Heneweer, M., van den Berg, M., Sanderson, J.T., 2004. A comparison of human H295R and rat R2C cell lines as *in vitro* screening tools for effects on aromatase. *Toxicol. Lett.* 146, 183–194.
- Hinfray, N., Porcher, J.M., Brion, F., 2006. Inhibition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) P450 aromatase activities in brain and ovarian microsomes by various environmental substances, submitted for publication.
- Hirsch, K.S., Jones, C.D., Lindstrom, T.D., Stamm, N.B., Sutton, G.P., Taylor, H.M., Weaver, D.E., 1987. Discovery and development of a novel class of nonsteroidal aromatase inhibitors. *Steroids* 50, 201–217.
- IFEN, 2003. Pesticides in Water. In: Tregouet, B. (Ed.), Proceedings of the Fifth Annual Report, 2001 data. Institut Français de l'Environnement, pp. 1–29.
- IFEN, 2004. Pesticides in water. In: Tregouet, B. (Ed.), Proceedings of the Sixth Annual Report, 2002 Data. Institut Français de l'Environnement, pp. 1–29.
- Kojima, H., Katsura, E., Takeuchi, S., Niyama, K., Kobayashi, K., 2004. Screening for estrogen and androgen receptor activities in 200 pesticides by *in vitro* reporter gene assays using Chinese hamster ovary cells. *Environ. Health Perspect.* 112, 524–531.
- Lemaire, G., Balaguer, P., Michel, S., Rahmani, R., 2005. Activation of retinoic acid receptor-dependent transcription by organochlorine pesticides. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 202, 38–49.
- Lemaire, G., Mnif, W., Pascussi, J.M., Pillon, A., Rabenoelina, F., Fenet, H., Gomez, E., Casellas, C., Nicolas, J.C., Cavailles, V., Duchesne, M.J., Balaguer, P., 2006a. Identification of new human PXR ligands among pesticides using a stable reporter cell system. *Toxicol. Sci.* 91, 501–509.
- Lemaire, G., Mnif, W., Mauvais, P., Balaguer, P., Rahmani, R., 2006b. Activation of alpha- and beta-estrogen receptors by persistent pesticides in reporter cell lines. *Life Sci.* 79, 1160–1169.
- Lephart, E.D., Simpson, E.R., 1991. Assay of aromatase activity. *Meth. Enzymol.* 206, 477–483.
- Loeliger, P., Bollag, W., Mayer, H., 1980. Arotinoids, a new class of highly active retinoids. *Eur. J. Med. Chem.* 15, 9–15.



- Means, G., Kilgore, M., Mahendroo, M., Mendelson, C., Simpson, E., 1991. Tissue-specific promoters regulate aromatase cytochrome P450 gene expression in human ovary and fetal tissues. *Mol. Endocrinol.* 5, 2005–2013.
- Mehta, D.V., Kim, Y.-S., Dixon, D., Jetten, A.M., 2002. Characterization of the expression of the retinoid-related, testis-associated receptor (RTR) in trophoblasts. *Placenta* 23, 281–287.
- Mendelson, C.R., Wright, E.E., Evans, C.T., Porter, J.C., Simpson, E.R., 1985. Preparation and characterization of polyclonal and monoclonal antibodies against human aromatase cytochrome P-450 (P-450AROM), and their use in its purification. *Arch. Biochem. Biophys.* 243, 480–491.
- Monod, G., De Mones, A., Fostier, A., 1993. Inhibition of ovarian microsomal aromatase and follicular oestradiol secretion by imidazole fungicides in Rainbow trout. *Mar. Environ. Res.* 35, 153–157.
- Morinaga, H., Yanase, T., Nomura, M., Okabe, T., Goto, K., Harada, N., Nawata, H., 2004. A benzimidazole fungicide, benomyl, and its metabolite, carbendazim, induce aromatase activity in a human ovarian granulosa-like tumor cell line (KGN). *Endocrinology* 145, 1860–1869.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* 65, 55–63.
- Nativelle-Serpentini, C., Richard, S., Seralini, G.-E., Sourdain, P., 2003. Aromatase activity modulation by lindane and bisphenol-A in human placental JEG-3 and transfected kidney E293 cells. *Toxicol. In Vitro* 17, 413–422.
- Nakanishi, T., Kohroki, J., Suzuki, S., Ishizaki, J., Hiromori, Y., Takasuga, S., Itoh, N., Watanabe, Y., Utoguchi, N., Tanaka, K., 2002. Trialkyltin compounds enhance human CG secretion and aromatase activity in human placental choriocarcinoma cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 2830–2837.
- Nakanishi, T., Nishikawa, J., Hiromori, Y., Yokoyama, H., Koyanagi, M., Takasuga, S., Ishizaki, J., Watanabe, M., Isa, S., Utoguchi, N., Itoh, N., Kohno, Y., Nishihara, T., Tanaka, K., 2005. Trialkyltin compounds bind retinoid X receptor to alter human placental endocrine functions. *Mol. Endocrinol.* 19, 2502–2516.
- Nishi, Y., Yanase, T., Mu, Y.M., Oba, K., Ichino, I., Saito, M., Nomura, M., Mukasa, C., Okabe, T., Goto, K., Takayanagi, R., Kashimura, Y., Haji, M., Nawata, H., 2001. Establishment and characterization of a steroidogenic human granulosa-like tumor cell line, KGN, that expresses functional follicle-stimulating hormone receptor. *Endocrinology* 142, 437–445.
- Ohno, K., Araki, N., Yanase, T., Nawata, H., Iida, M., 2004. A novel nonradioactive method for measuring aromatase activity using a human ovarian granulosa-like tumor cell line and an estrone ELISA. *Toxicol. Sci.* 82, 443–450.
- Ritvos, O., Voutilainen, R., 1992. Regulation of aromatase cytochrome P-450 and 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase messenger ribonucleic acid levels in choriocarcinoma cells. *Endocrinology* 130, 61–67.
- Saitoh, M., Yanase, T., Morinaga, H., Tanabe, M., Mu, Y.-M., Nishi, Y., Nomura, M., Okabe, T., Goto, K., Takayanagi, R., Nawata, H., 2001. Tributyltin or triphenyltin inhibits aromatase activity in the human granulosa-like tumor cell line KGN. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289, 198–204.
- Sanderson, J.T., Boerma, J., Lansbergen, G.W.A., van den Berg, M., 2002. Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 182, 44–54.
- Sanderson, J.T., Letcher, R.J., Heneweer, M., Giesy, J.P., van den Berg, M., 2001. Effects of chloro-*s*-triazine herbicides and metabolites on aromatase activity in various human cell lines and on vitellogenin production in male carp hepatocytes. *Environ. Health Perspect.* 109, 1027–1031.
- Sanderson, J.T., Seinen, W., Giesy, J.P., van den Berg, M., 2000. 2-Chloro-*s*-triazine herbicides induce aromatase (CYP19) activity in H295R human adrenocortical carcinoma cells: a novel mechanism for estrogenicity? *Toxicol. Sci.* 54, 121–127.
- Simpson, E., Mahendroo, M., Means, G., Kilgore, M., Corbin, C., Mendelson, C., 1993. Tissue-specific promoters regulate aromatase cytochrome P450 expression. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 44, 321–330.
- Sonnenschein, C., Soto, A., 1998. An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 65, 143–150.
- Sun, T., Zhao, Y., Mangelsdorf, D.J., Simpson, E.R., 1998. Characterization of a region upstream of exon I 1 of the human CYP19 (Aromatase) gene that mediates regulation by retinoids in human choriocarcinoma cells. *Endocrinology* 139, 1684–1691.
- Thompson Jr., E.A., Siiteri, P.K., 1974. Utilization of oxygen and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate by human placental microsomes during aromatization of androstenedione. *J. Biol. Chem.* 249, 5364–5372.
- Vindimian, E., 2006. REGTOX: macro Excel™ for dose-response modelling. Available: <http://eric.vindimian.9online.fr/> [accessed May 3, 2006].
- Vinggaard, A.M., Hnida, C., Breinholt, V., Larsen, J.C., 2000. Screening of selected pesticides for inhibition of CYP19 aromatase activity in vitro. *Toxicol. In Vitro* 14, 227–234.
- Yang, C., Chen, S., 1999. Two organochlorine pesticides, toxaphene and chlordane, are antagonists for estrogen-related receptor alpha-1 orphan receptor. *Cancer Res.* 59, 4519–4524.
- You, L., Sar, M., Bartolucci, E., Ploch, S., Whitt, M., 2001. Induction of hepatic aromatase by *p,p'*-DDE in adult male rats. *Mol. Cell. Endocrinol.* 178, 207–214.
- Yue, W., Brodie, A.M.H., 1997. Mechanisms of the actions of aromatase inhibitors 4-hydroxyandrostenedione, fadrozole, and aminoglutethimide on aromatase in JEG-3 cell culture. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 63, 317–328.
- Zhu, S.J., Li, Y., Li, H., Wang, Y.L., Xiao, Z.J., Vihko, P., Piao, Y.S., 2002. Retinoic acids promote the action of aromatase and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 on the biosynthesis of 17beta-estradiol in placental cells. *J. Endocrinol.* 172, 31–43.

